



Devenir des antibiotiques et des populations d'*Escherichia coli* et d'*Enterococcus* spp. dans les hydrosytèmes de surface

K. Oberlé

► To cite this version:

K. Oberlé. Devenir des antibiotiques et des populations d'*Escherichia coli* et d'*Enterococcus* spp. dans les hydrosytèmes de surface. Interfaces continentales, environnement. Université de Rouen, 2012. Français. NNT : . tel-00828033

HAL Id: tel-00828033

<https://theses.hal.science/tel-00828033>

Submitted on 13 Jun 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Rouen
UFR des Sciences et Techniques

THESE

Pour l'obtention du grade de docteur de l'Université de Rouen

Discipline : Biologie

Spécialité : Ecologie Microbienne

Devenir des antibiotiques et des populations d'*Escherichia coli* et
d'*Enterococcus* spp. dans les hydrosystèmes de surface

Kenny Oberlé

Directrice de thèse : F. PETIT, Professeur à l'Université de Rouen, UMR CNRS 6143 M2C

Co-directeur de thèse : N. MASSEI, Professeur à l'Université de Rouen, UMR CNRS 6143 M2C

Soutenue publiquement le 28 novembre 2012

Membres du jury :

M. P. SERVAIS , Professeur à l'Université Libre de Bruxelles, Ecologie des Systèmes aquatiques	Rapporteur
M. E. TOPP , Directeur de recherche, Insitut Agriculture et Agroalimentaire Canada	Rapporteur
Mme H. BUDZINSKI , Directrice de recherche à l'Université de Bordeaux 1, UMR CNRS 5805	Examineur
M. E. DENAMUR , Professeur à l'Université de Paris 7, INSERM U722	Examineur
M. R. LECLERCQ , Professeur à l'Université de Caen, EA 4655, CHU Caen	Examineur

Les travaux présentés ont été effectués au sein du groupe de microbiologie de l'UMR CNRS 6143 M2C – Morphodynamique Continentale et Côtière, sous la direction du professeur Fabienne PETIT. Le projet FLASH a bénéficié d'un co-financement par le programme Seine-Aval 4, le CNRS (EC2CO), et d'une allocation doctorale (SFR SCALE – REIVE). Ces travaux ont été réalisés grâce à la collaboration active de la municipalité de la ville de Pont-Audemer, des médecins hospitaliers, de l'éleveur et du vétérinaire appartenant au groupement de défense sanitaire (GDS).

SOMMAIRE

INDEX FIGURES – TABLEAUX	p.6
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	p.10
1. Bilans des consommations en médecines humaine et vétérinaire	p.11
1.1. Les substances médicamenteuses	p.11
1.2. Les antibiotiques	p.12
2. Devenir des résidus médicamenteux dans les environnements aquatiques	p.14
2.1. Origine et sources de contamination	p.14
2.2. Impact des rejets de stations d'épurations	p.16
2.3. Occurrence et persistance des résidus médicamenteux	p.16
2.4. Devenir des antibiotiques	p.19
2.4.1. Les β -lactamines	p.19
2.4.2. Les sulfamides	p.19
2.4.3. Les tétracyclines	p.20
2.4.4. Les quinolones et fluoroquinolones	p.20
2.4.5. Les macrolides	p.22
3. Impact des antibiotiques sur l'écosystème aquatique	p.23
4. Contamination des eaux par les bactéries fécales antibio-résistantes	p.24
4.1. <i>Escherichia coli</i> et <i>Enterococcus</i>	p.25
4.2. La résistance bactérienne aux antibiotiques	p.26
4.2.1. Mécanismes et supports de la résistance	p.27
4.2.2. La dissémination des gènes de résistance	p.28
Objectifs des travaux de thèse	p.31

CHAPITRE 1 :

Devenir des antibiotiques et des populations d'<i>Escherichia coli</i> et d'<i>Enterococcus</i> spp. le long d'un continuum centre de soins – STEP – rivière	p.32
1. Contexte	p.33
2. Objectif	p.34
3. Démarche et stratégie expérimentale	p.34
4. Résultats et discussion	p.35
5. Conclusions	p.43
6. Articles	p.44

CHAPITRE 2 :

Devenir des antibiotiques et des populations d'<i>Escherichia coli</i> et d'<i>Enterococcus</i> spp. le long d'un continuum exploitation bovine - zone urbanisée	p.85
1. Contexte	p.86
2. Objectif	p.86
3. Démarche et stratégie expérimentale	p.87
3.1. Site d'étude et stratégie d'échantillonnage	p.87
3.2. Consommation en antibiotiques	p.88
3.3. Analyses chimiques et microbiologiques	p.88
4. Résultats et discussion	p.90
4.1. Consommations en antibiotiques et contamination des eaux par les résidus d'antibiotiques	p.90
4.2. Qualité microbiologique des eaux le long du continuum exploitations bovines – zone urbanisée	p.90
4.3. Evolution de la structure des populations d'<i>E. coli</i> et d'<i>Enterococcus</i> le long du continuum	p.92
4.4. Impact des pratiques d'élevage des bovins sur la structure des populations d'<i>E. coli</i> dans les eaux	p.94
4.5. Impact du gradient d'urbanisation sur la contamination en <i>E. coli</i> et <i>Enterococcus</i> antibio-résistantes	p.95
5. Conclusions	p.95

CHAPITRE 3 :

Modélisation du fonctionnement hydrologique de la Risle et essais de bilans quantitatifs des transferts d'*Escherichia coli* à l'aide du modèle conceptuel GR p.97

1. Modélisation du fonctionnement hydrologique de la Risle p.98

1.1. Contextes géologique, géomorphologique et hydrogéologique p.98

1.2. Essai de modélisation pluie-débit à différentes stations de l'amont vers l'aval p.100

1.2.1. Collecte des données p.100

1.2.2. Description du modèle conceptuel GR journalier, mensuel, annuel p.100

1.2.2.1. Le modèle GR4J p.102

1.2.2.2. Le modèle GR2M p.102

1.2.2.3. Le modèle GR1A p.103

1.2.3. Application du modèle GR p.103

2. Premiers essais de modélisation des transferts de contaminants microbiologiques à l'échelle d'un bassin versant p.104

2.1. Choix du bassin versant et modélisation des débits p.104

2.2. Premiers essais de modélisation des transferts d'*Escherichia coli* p.106

3. Conclusions et perspectives p.108

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES p.109

MATERIEL ET METHODES p.111

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES p.118

ANNEXES p.133

INDEX FIGURES – TABLEAUX

Synthèse Bibliographique

Figure 1: Mécanismes cellulaires ciblés par les différentes familles d'antibiotiques [d'après Walsh, 2000].

Figure 2: Répartition des consommations en antibiotiques dans les régions de France métropolitaine [Affsaps, 2011].

Figure 3: Schéma des sources possibles et des voies de contamination des substances médicamenteuses dans les environnements aquatiques.

Figure 4: Schéma des traitements des effluents bruts dans une station d'épuration, et processus responsables de la dégradation ou du piégeage des résidus médicamenteux pour chaque étape.

Figure 5 : Voie de transformation potentielle de l'amoxicilline [adaptée de Längin et al., 2009].

Figure 6 : Voies majoritaires de transformations potentielles de l'amoxicilline après hydrolyse [d'après Pérez-Parada et al., 2011].

Figure 7 : Spéciation de la tétracycline en fonction du pH [d'après Gu et al., 2007].

Figure 8: Spéciation des molécules de ciprofloxacine en fonction du pH [d'après Wunder et al., 2011].

Figure 9 : Structure chimique de la ciprofloxacine comprenant un groupement carboxyle ($pK_a=6.1$) et un groupement amine ($pK_a=8.7$) dont les charges sont dépendantes du pH.

Figure 10 : Structures potentielles des produits de photolyse de l'azithromycine (d'après Tong et al., 2011).

Figure 11: Classification phylogénétique de la population d'*Escherichia coli* [Tenaillon et al., 2010].

Figure 12: Principaux mécanismes cellulaires mis en jeu pour la résistance bactérienne aux antibiotiques [d'après Levy et Marshall, 2004].

Figure 13: Schéma des différents supports génétiques et d'une structure en "mosaïque" [d'après Martinez, 2009].

Figure 14: Mécanismes de dissémination de gènes de résistance aux antibiotiques chez les bactéries [modifié d'après Andersson et Hughes, 2010].

Tableau 1: Niveaux 1 et 2 du classement ATC (Anatomique, Thérapeutique, Chimique) pour la médecine humaine (OMS, 2009).

Tableau 2: Liste des produits vendus dans les pharmacies en 2009 en valeur (millions de dollars) et en quantités (tonnes) [Affsaps, 2011].

Tableau 3: Comparaison des consommations en antibiotiques de ville dans plusieurs pays européens.

Tableau 4: Evolution de la consommation des principales classes d'antibiotiques utilisés à l'hôpital (classification ATC) en Dose Définie Journalière par 1000 habitants et par jour (DDJ/1000H/J) [Affsaps, 2011].

Tableau 5 : Evolution du poids vif traité par famille d'antibiotiques entre 1999 et 2010 pour l'espèce bovine [ANSES, 2010].

Tableau 6: Concentrations en résidus médicamenteux en fonction de l'origine de l'échantillon et de la méthode d'analyse.

Tableau 7: Principaux coefficients impliqués dans le devenir des résidus médicamenteux.

Tableau 8 : Coefficient de partitionnement des substances médicamenteuses à caractère lipophile.

Tableau 9 : Coefficient de partitionnement des substances médicamenteuses à caractère hydrophile.

Tableau 10: Processus de dégradation et demi-vie ($T_{1/2}$) des antibiotiques dans les environnements aquatiques.

Tableau 11: Exemples de stratégies de résistance aux antibiotiques mises en place par les bactéries [d'après Davies et Davies, 2010 ; van Hoek et al., 2011].

Chapitre 1

Devenir des antibiotiques et des populations d'*Escherichia coli* et d'*Enterococcus* spp. le long d'un continuum centre de soins – STEP - rivière

Figure 15: Cartographie du bassin versant de la Seine (PIREN-Seine). Les programmes PIREN-Seine (<http://www.sisyphe.upmc.fr/piren/>) et Seine-Aval (<http://www.seine-aval.fr>) étudient l'impact de la pression anthropique sur la contamination chimique et microbiologique des eaux en têtes de bassin jusqu'à l'embouchure de la Seine.

Figure 16: Cartographie du site atelier de la Risle.

Figure 17: Stratégie d'échantillonnage le long du continuum centre de soins - STEP – rivière.

Figure 18: Evolution du complexe clonal CC17 au sein de l'espèce *E. faecium* le long du continuum hospitalier.

Tableau 12: Contamination en *E. coli* et *Enterococcus* le long du continuum centre de soins - STEP – rivière.

Tableau 13: Prescriptions en antibiotiques à l'hôpital, la maison de retraite et par la médecine de ville lors de deux périodes.

Tableau 14 : Contamination en antibiotiques et *E. coli* antibio-résistantes dans les effluents du centre hospitalier pendant une période de faible consommation en antibiotiques (Juin 2009).

Tableau 15 : Contamination en antibiotiques et *E. coli* antibio-résistantes dans les effluents du centre hospitalier pendant une période de forte consommation en antibiotiques (Décembre 2009).

Tableau 16: Contamination en antibiotiques et *E. coli* antibio-résistantes dans les effluents brut et traité de la STEP lors de deux périodes d'échantillonnage (Juin 2009, Déc. 2009).

Tableau 17: Contamination en antibiotiques et *E. coli* antibio-résistantes du rejet de l'effluent traité de la STEP dans la rivière lors de deux périodes d'échantillonnage (Juin 2009, Déc. 2009).

Tableau 18: Structure des populations d'*E. coli* isolées le long du continuum centre de soins – STEP – rivière.

Tableau 19 : Pourcentage de souches d'*E. coli* antibio-résistantes et occurrences des intégrons de classe 1 et 2 en période de faible consommation en antibiotiques (Décembre 2009).

Tableau 20: Pourcentage de souches d'*E. coli* antibio-résistantes et occurrences des intégrons de classe 1 et 2 en période de faible consommation en antibiotiques (Juin 2009).

Tableau 21: Contaminations en antibiotiques et enterococci résistants aux antibiotiques dans les eaux du continuum centre de soins – STEP – rivière.

Tableau 22: Résistance à l'érythromycine et distribution des gènes de résistance aux macrolides chez les entérocoques.

Tableau 23 : Occurrence d'intégrases de classe 1 (*intI1*) et profils phénotypiques de résistances aux antibiotiques chez les isolats d'*E. coli* de l'effluent de la maison de retraite pour la campagne de décembre 2009.

Chapitre 2

Devenir des antibiotiques et des populations d'*Escherichia coli* et d'*Enterococcus* spp. le long d'un continuum exploitation bovine - zone urbanisée

Figure 19: Cartographie de l'usage des sols et stratégie d'échantillonnage le long du bassin versant de la Tourville

Figure 20: Débit de la Risle (—◆—), pluies cumulées (—) et pluviométrie (■) au cours d'une année hydrologique.

Tableau 24: Contamination en *Escherichia coli* et *Enterococcus* dans les eaux le long du continuum exploitation agricole – zone urbanisée.

Tableau 25: Quantification des antibiotiques dans les eaux lors de la stabulation (1) et le pâturage (2) des bovins.

Tableau 26: Consommation en antibiotiques pour le traitement du cheptel de 450 bovins.

Tableau 27: Normes pour la qualité microbiologique des eaux douces intérieures à usage récréatifs pour l'Union Européenne, le Canada et les Etats-Unis.

Tableau 28: Evolution de la structure des populations d'*E. coli* isolées dans les eaux le long du continuum exploitation agricole – zone urbanisée.

Tableau 29: Distribution des espèces d'entérocoques et antibio-résistance des isolats lors de la période de pâturage des bovins.

Tableau 30: Caractérisation des *E. coli* pathogènes β -D-glucuronidase positives isolées des eaux.

Tableau 31: Distribution des mécanismes de résistance aux macrolides et à la tétracycline parmi les entérocoques isolés des eaux.

Chapitre 3 :

Modélisation du fonctionnement hydrologique de la Risle et essais de bilans quantitatifs des transferts d'*Escherichia coli* à l'aide du modèle conceptuel GR

Figure 21: Couverture Corine Land Cover de l'occupation des sols sur le bassin versant de la Risle.

Figure 22: Contexte structural du département de l'Eure.

Figure 23: Schéma du contexte hydrogéologique du bassin versant de la Risle.

Figure 24: Bassins versants hydrogéologiques en Haute-Normandie (a) et épaisseur de l'aquifère de la Craie dans l'Eure (b).

Figure 25: Localisation des stations de jaugeage (a) et des stations pluviométriques sur le bassin de la Risle (b).

Figure 26: Schéma conceptuel du modèle GR4J [d'après Perrin *et al.*, 2003].

Figure 27: Schéma conceptuel du modèle GR2M [d'après Mouelhi, 2006a].

Figure 28: Résultat du calage des modèles GR4J (a), GR2M (b) et GR1A (c) pour la station de Rai.

Figure 29: Cartographie du bassin versant de la Tourville et de son usage des sols.

Figure 30: Localisation des sous unités choisies sur le bassin versant de la Risle.

Figure 31: Modélisation du débit total (Q) à partir des contributions par le ruissellement (Qd) et le débit de base (Qr) au niveau du bassin versant de la Tourville.

Figure 32: Modélisation des débits (Q) à la Tourville et des contributions du débit de base (Qr), des ruissellements (Qd) au cours de la campagne de novembre 2009 (A) et de juin 2010 (B).

Figure 33: Flux d'*E. coli* à l'exutoire du bassin versant de la Tourville selon les données de débits du modèle GR4J.

Figure 34: Flux d'*E. coli* résistantes à au moins un antibiotique à l'exutoire du bassin versant de la Tourville.

Tableau 32: Stations de jaugeage sur le bassin de la Risle.

Tableau 33: Critères de Nash-Sutcliffe obtenus après calage des différents modèles pour les quatre stations (Bocquencé, Rai, Grosley-sur-Risle et Pont-Authou).

Tableau 34: Comparaison morphologique des bassins versants de la Tourville et de la Charentonne à Bocquencé selon plusieurs paramètres.

Tableau 35: Densités en *E. coli* dans les eaux du site n°3 (Tourville) durant la stabulation (nov. 2009) et le pâturage des bovins (juin 2010).

Tableau 36: Niveaux de contaminations retenus selon les contributions des ruissellements au débit total.

Matériel et méthodes

Tableau 37 : Antibiotiques testés pour la détermination des phénotypes de résistance

Tableau 38 : Amorces oligonucléotidiques utilisées.

Tableau 39: Mélanges réactionnels des PCR effectuées.

Tableau 40: Programmes des cycles d'amplification par PCR.

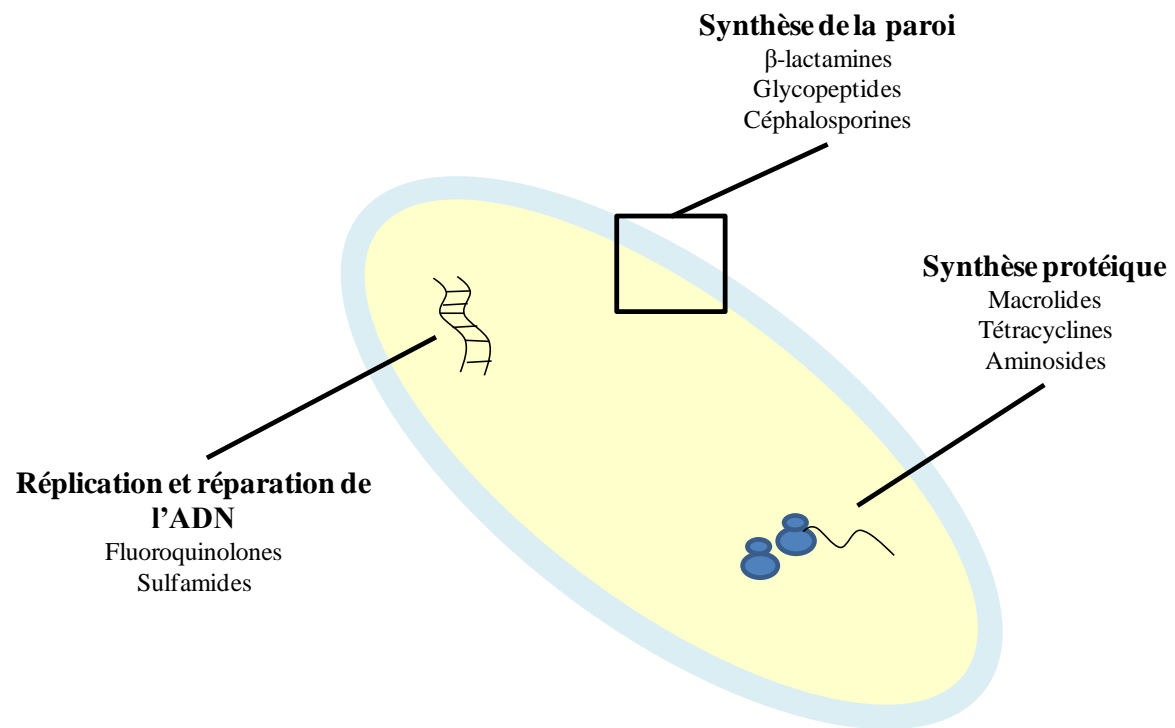


Figure 1: Mécanismes cellulaires ciblés par les différentes familles d'antibiotiques [d'après Walsh, 2000].

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Parmi les substances médicamenteuses¹, seuls les antibiotiques sont des molécules produites naturellement par les microorganismes des sols. La sécrétion de ces molécules favoriserait la colonisation de leur niche écologique, ou seraient impliqués dans la communication au sein des populations [Fajardo et Martinez, 2008]. En 1928, la découverte de la pénicilline par Alexander Fleming a ouvert l'ère thérapeutique de ces molécules. Par la suite, la production massive d'antibiotiques pour la médecine humaine et vétérinaire a permis de soigner et d'éradiquer des infections d'origine bactérienne (*i.e* tuberculose, syphilis). Ces molécules agissent sur plusieurs mécanismes cellulaires impliqués dans la biosynthèse de la paroi, de protéines et la réplication de l'ADN. Elles peuvent inhiber la croissance bactérienne : effet bactériostatique, ou en provoquant la mort cellulaire : effet bactéricide (Figure 1). Pour lutter contre ces effets, les bactéries ont développé des mécanismes de résistance « naturelle », retrouvés au sein d'une même espèce, ou de résistance « acquise » résultant de transferts horizontaux de gènes entre bactéries et/ou de mutations. L'amélioration en santé humaine et animale due à l'usage d'antibiotiques est toutefois responsable de l'augmentation de souches bactériennes antibio-résistantes. En 2001, l'Organisation Mondiale de la Santé considère l'émergence de ce phénomène comme un problème majeur en santé publique.

Les bactéries antibio-résistantes, majoritairement sélectionnées chez les hommes et animaux sous traitement antibiotique, vont ensuite être rejetées dans les eaux usées ou sur les sols et contaminer les environnements aquatiques. A ce problème s'ajoute aujourd'hui celui des rejets de substances médicamenteuses dont les effets sur les environnements aquatiques sont encore peu connus. En effet, la contamination simultanée par de faibles concentrations en antibiotiques et des bactéries allochtones antibio-résistantes soulève de nombreuses interrogations sur la relation entre ces contaminants et le maintien, la sélection et le transfert de la résistance aux antibiotiques au sein des communautés autochtones des hydrosystèmes.

¹ Dans ce manuscrit, le terme « substance médicamenteuse » définit un composé avec un principe actif alors que le terme de « résidu médicamenteux » désignera un composé rejeté dans l'environnement à la suite de sa métabolisation complète ou partielle par l'organisme traité.

Tableau 1: Niveaux 1 et 2 du classement ATC (Anatomique, Thérapeutique, Chimique) pour la médecine humaine (OMS, 2009).

A- Voies Digestives et Métabolisme A01 préparations stomatologiques A02 médicaments pour les troubles de l'acidité A03 médicaments pour les troubles fonctionnels gastro-intestinaux A04 antiémétiques and antinauséux A05 thérapie hépatique (bile et foie) A06 laxatives A07 antidiarrhéique, antiinflammatoire intestinal/ agent antiinfectieux A08 préparations antiobésité, à l'exclusion des produits diététiques A09 médicaments de la digestion A10 médicaments du diabète A11 vitamines A12 suppléments minéraux A13 toniques A14 anabolisants à usages systémique A15 stimulants de l'appétit A16 autres médicaments du système digestif et du métabolisme	B- Sang et organes hématopoïétiques B01 antithrombotiques B02 antihémorragiques B03 préparations antianémiques B05 substituts du sang et solution de perfusion B06 autres agents hématologiques
D- Médicaments dermatologiques D01 antifongiques pour usage dermatologique D02 émollients et protecteurs D03 préparations pour traitement des plaies et ulcères D04 antiprurigineux incluant les anesthésiques D05 médicaments contre le psoriasis D06 antibiotiques et anticancéreux pour usage dermatologique D07 préparations dermatologiques corticoïdes D08 antiseptiques et désinfectants D09 pansements médicamenteux D10 préparations antiacnéiques D11 autres préparations dermatologiques	C- Système cardio-vasculaire C01 médicaments en cardiologie C02 antihypertenseurs C03 diurétiques C04 vasodilatateurs périphériques C05 vasculoprotecteurs C07 bêtabloquants C08 inhibiteurs calciques C09 médicaments du système rénine-angiotensine C10 hypolipémiants
J- Antiinfectieux J01 antibactériens à usage systémique J02 antimycosiques à usage systémique J04 antimycobactériens J05 antiviraux à usage systémique J06 immunsérums et immunoglobulines J07 vaccins	G- Médicaments du système génito-urinaire et hormones sexuelles G01 antiinfectieux et antiseptiques gynécologiques G02 autres médicaments gynécologiques G03 hormones sexuelles et modulateurs de système génital G04 médicaments urologiques
L- Antinéoplasiques et immunomodulateurs L01 antinéoplasiques L02 thérapeutique endocrine L03 immunostimulants L04 immunosuppresseurs	H- Hormones systémiques, hors hormones sexuelles et insulines H01 hormones hypophysaires et analogues H02 corticoïdes à usage systémiques H03 médicaments de la thyroïde H04 hormones pancréatiques H05 médicaments de l'équilibre calcique
P- Produits antiparasitaires, insecticides et répellants P01 antiprotozoaires P02 anthelminthiques P03 antiparasitaires externes, incluant scabicides, insecticides et	M- Muscles et squelette M01 antiinflammatoires et antirhumatismal M02 produits topiques pour douleurs articulaire et musculaire M03 myorelaxants M04 antigoutteux M05 médicaments des désordres osseux M09 autres médicaments des désordres musculaires et osseux
V- Divers V01 allergènes V03 tous autres médicaments V04 médicaments pour le diagnostic V06 nutriments V07 tous autres produits non-thérapeutiques V08 produits de contrastes V09 diagnostic radiopharmaceutique V10 thérapeutique radiopharmaceutique	N- Système nerveux N01 anesthésiques N02 analgésiques N03 antiépileptiques N04 antiparkinsoniens N05 psycholeptiques N06 psychoanaleptiques N07 autres médicaments du système nerveux
	R- Système respiratoire R01 préparations nasales R02 préparations pour la gorge R03 médicaments des syndromes obstructifs des voies aériennes R05 médicaments rhume et toux R06 antihistaminiques à usage systémique R07 autres médicaments du système respiratoire
	S- Organes sensoriels S01 médicaments ophtalmologiques S02 médicaments otologiques S03 préparations ophtalmologiques et otologiques

1. Bilans des consommations en médecines humaine et vétérinaire

1.1. Les substances médicamenteuses

A l'échelle mondiale, près de 80% de la production pharmaceutique est consommée par l'Europe, l'Amérique du Nord et le Japon qui ne représentent que 15% de la population totale [Rapport de l'académie nationale de pharmacie, 2008]. Afin de faire un bilan de la consommation en substances médicamenteuses, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a défini une classification ATC (Anatomique, Thérapeutique, Chimique) qui différencie les composés pharmaceutiques en fonction de leurs cibles d'action (organe) et de leurs caractéristiques thérapeutiques et/ou chimiques (Tableau 1). Cette classification repose sur cinq niveaux de codification, ainsi, le code J01CA04 informe qu'il s'agit d'un agent anti-infectieux (J), anti-bactérien à usage systémique (J01) appartenant à la famille des bêta-lactamines (J01C), plus précisément une pénicilline à spectre large (J01CA) : l'amoxicilline (J01CA04).

A l'exception des antibiotiques dont la consommation a été estimée entre 100 000 et 200 000 tonnes par an à l'échelle mondiale [Wise, 2002], aucun bilan quantitatif de la consommation des substances médicamenteuses en médecine humaine n'est accessible. Seuls des bilans en chiffre d'affaires (milliards de dollars) sont disponibles mais ces données sont peu informatives car les législations varient selon les pays, et le chiffre d'affaires n'est pas toujours proportionnel à la quantité consommée. Ainsi, le Doliprane® (antalgique), médicament le plus utilisé en France est classé 8^e en chiffre d'affaires [AFFSAPs, 2011]. Dans le cas des antibiotiques, ces molécules sont en vente libre aux Etats-Unis (*i.e* ciprofloxacine, amoxicilline) alors qu'elles nécessitent une prescription médicale en France.

En France, l'AFSSAPs (2007) a classé les médicaments en termes de chiffres d'affaires. Ainsi, les coûts les plus importants sont dus aux ventes de 9 catégories de médicaments : les substances agissant sur le système rénine-angiotensine, sur la régulation de lipides dans le sang, sur les troubles de l'acidité gastrique, sur les syndromes obstructifs des voies aériennes, auxquels s'ajoutent les analgésiques, les psycholytiques, les hypnotiques et les antibiotiques. En 2011, une classification de 3000 substances médicamenteuses délivrées dans les hôpitaux et les pharmacies a permis d'identifier l'importance économique de 50 molécules liées à leurs coûts et leurs consommations (Tableau 2). Dans ce classement un seul antibiotique (Pristinamycine, Pyostacine®) est retrouvé.

Alors qu'en médecine humaine, de nombreuses substances médicamenteuses appartenant à des catégories différentes sont prescrites : antibiotiques, anti-cancéreux,

Tableau 2: Liste des produits vendus dans les pharmacies en 2009 en valeur (millions de dollars) et en quantités (tonnes) [Affsaps, 2011].

1- En valeur			2- En quantités		
Rang 2009 (rang 2008)	Produit	Classe	Rang 2009 (rang 2008)	Produit	Classe
1 (1)	PLAVIX	Antiagrégant plaquettaire	1 (1)	DOLIPRANE	Antalgique
2 (2)	TAHOR	Hypolipédiant	2 (3)	DAFALGAN	Antalgique
3 (3)	SERETIDE	Antiasthmatique	3 (2)	EFFERALGAN	Antalgique
4 (4)	INEXIUM	Antiulcéreux	4 (4)	LEVOTHYROX	Hormones
5 (6)	ENBREL	Immunosuppresseur	5 (5)	KARDEGIC	Antiagrégant plaquettaire
6 (7)	CRESTOR	Hypolipédiant	6 (6)	SPASFON	Antispasmodique
7 (14)	HUMIRA	Immunosuppresseur	7 (10)	IXPRIM	Antalgique
8 (13)	DOLIPRANE	Antalgique	8 (8)	VOLTARENE	Antiinflammatoire
9 (15)	LUCENTIS	Traitement DMLA	9 (7)	ELUDRIL	O.R.L. - Antibactérien
10 (9)	SYMBICORT	Antiasthmatique	10 (9)	TAHOR	Hypolipédiant
11 (8)	GLIVEC	Antinéoplasique	11 (15)	INEXIUM	Antiulcéreux
12 (10)	ARANESP	Antianémique	12 (13)	GAVISCON	Traitement du RGO
13 (21)	LOVENOX	Anticoagulant	13 (11)	METHADONE	Traitement substitutif
14 (20)	LANTUS	Antidiabétique	14 (18)	HELICIDINE	Antitussif
15 (27)	TRUVADA	Antiviral systémique	15 (19)	LAMALINE	Antalgique
16 (17)	NEULASTA	Immunostimulant - Facteur de croissance	16 (22)	TOPLEXIL	Antitussif
17 (18)	COAPROVEL	Antihypertenseur	17 (14)	PIASCLEDINE	Antirhumatismal
18 (32)	INEGY	Hypolipédiant	18 (21)	AERIUS	Antihistaminique
19 (19)	APROVEL	Antihypertenseur	19 (20)	ADVIL	Antalgique
20 (26)	SINGULAIR	Antiasthmatique	20 (23)	DEXERYL	Préparation dermatologique
21 (33)	LYRICA	Antiépileptique	21 (24)	RHINOFLUIMUCIL	O.R.L.
22 (16)	PREVENAR	Vaccin	22 (28)	CRESTOR	Hypolipédiant
23 (31)	PARIET	Antiulcéreux	23 (17)	PLAVIX	Antiagrégant plaquettaire
24 (28)	AVONEX	Immunostimulant - Trait. sclérose en plaques	24 (25)	METEOSPASMYL	Antispasmodique
25 (24)	ARIMIDEX	Thérapeutique endocrine - Tumeur du sein	25 (27)	VASTAREL	Antiangoreux
26 (25)	COTAREG	Antihypertenseur	26 (26)	ASPEGIC	Antalgique
27 (34)	ZYPREXA	Neuroleptique	27 (33)	PIVALONE	O.R.L.
28 (35)	PYOSTACINE	Antibiotique	28 (30)	PREVISCAN	Antithrombotique
29 (39)	SEROPLEX	Antidépresseur	29 (32)	BETADINE	Antiseptique
30 (5)	GARDASIL	Vaccin	30 (12)	FORLAX	Laxatif
31 (29)	NEORECORMON	Antianémique	31 (31)	EMLAPATCH	Anesthésique local
32 (12)	COVERSYL	Antihypertenseur	32 (33)	VENTOLINE	Antiasthmatique
33 (30)	ARICEPT	Maladie d'Alzheimer	33 (38)	SMECTA	Antidiarrhéique
34 (22)	ZELITREX	Antiviral systémique	34 (29)	NUROFEN	Antalgique
35 (36)	SPIRIVA	Traitement bronchodilatateur des BPCO	35 (16)	MAGNE B6	Supplément minéral
36 (41)	DAFALGAN	Antalgique	36 (36)	SUBUTEX	Traitement substitutif
37 (42)	IEZETROL	Hypolipédiant	37 (41)	SERESTA	Anxiolytique
38 (45)	IXPRIM	Antalgique	38 (78)	OSCILLOCOCINUM	Homéopathie
39 (37)	EPREX	Antianémique	39 (39)	PROFEMIGR	Antiinflammatoire
40 (46)	AERIUS	Antihistaminique	40 (43)	HUMEX	Décongestionnant à usage systémique
41 (11)	INIPOMP	Antiulcéreux	41 (85)	BIOCALYPTOL	Antitussif
42 (40)	TAREG	Antihypertenseur	42 (73)	SEROPLEX	Antidépresseur
43 (47)	VASTAREL	Antiangoreux	43 (59)	FERVEX	Antihistaminique
44 (52)	EBIXA	Maladie d'Alzheimer	44 (45)	ATARAX	Anxiolytique
45 (38)	ACTONEL	Traitement ostéoporose	45 (64)	RHINTROPHYL	O.R.L.
46 (61)	EFFERALGAN	Antalgique	46 (72)	ZALDIAR	Antalgique
47 (57)	PIASCLEDINE	Antirhumatismal	47 (61)	DERINOX	Préparation nasale
48 (51)	GRANOCYTE	Immunostimulant - Facteur de croissance	48 (49)	TARDYFERON	Antianémique
49 (53)	XALATAN	Antiglaucmateux et myotiques	49 (46)	DONORMYL	Sédatif
50 (54)	TARCEVA	Antinéoplasique	50 (58)	DIPROSONE	Préparation dermatologique

anti-dépresseurs, régulateurs de lipides sanguins. En médecine vétérinaire, les antibiotiques sont les molécules majoritairement prescrites.

1.2. Les antibiotiques

La Grèce, la France, l'Italie, la Belgique et la Pologne sont les cinq pays européens consommant des doses définies journalières (DDJ) d'antibiotiques en ville supérieures à 20 DDJ pour 1000 habitants (Tableau 3). En France, les régions du Nord – Pas de Calais, de la Picardie et de la Champagne-Ardenne consomment le plus d'antibiotiques avec des doses journalières supérieures à 32 pour 1000 habitants (Figure 2). La Haute-Normandie, où sera localisée l'étude présentée dans cette thèse, appartient aux régions qui consomment également de grandes quantités d'antibiotiques avec des doses comprises entre 30 et 32 DDJ pour 1000 habitants. Dans les hôpitaux français, les consommations sont plus faibles avec des doses journalières qui ont diminué de 2,8 à 2,2 DDJ de 1999 à 2009 (Tableau 4).

En médecine vétérinaire, à partir de l'extrapolation des données de consommation et des densités d'animaux d'élevage de sept pays (Danemark, France, Finlande, Allemagne, Suède, Pays-Bas et Royaume-Uni), Kools *et al* (2008) ont estimé les quantités des trois catégories de substances médicamenteuses majoritairement utilisées à l'échelle des 25 pays dans la communauté européenne : 5393 tonnes d'antibiotiques (96,4%), 194 tonnes de substances anti-parasitaires (3,5%) et 4,6 tonnes d'hormones (0,1%). Toutefois, des molécules sont spécifiquement prescrites dans certains pays, ainsi, en Suède et au Royaume-Uni, il faut ajouter 221 tonnes de substances pour traiter les problèmes gastriques et métaboliques, 120 tonnes pour les maladies du système nerveux central, 60 tonnes pour le traitement des maladies hématopoïétiques et 52 tonnes pour les troubles musculo-squelettiques.

En 11 ans, une diminution de 1330 tonnes (1999) à 1014 tonnes (2010) d'antibiotiques vendus a été observée pour la médecine vétérinaire en France [ANSES, 2010]. Cette diminution importante s'explique par l'interdiction de l'utilisation d'antibiotiques comme facteur de croissance en Europe depuis 2006. Aujourd'hui, les tétracyclines (46,54%) et les sulfamides (17,16%) sont les familles les plus utilisées pour traiter les bovins, les porcins, les animaux domestiques (chats, chiens) ou encore les poissons (pisciculture) [ANSES, 2010]. Le poids vif² des bovins traités a évolué entre 1999 et 2010 selon les familles d'antibiotiques (Tableau 5). Ainsi, les poids vifs traités aux fluoroquinolones, macrolides et tétracyclines ont augmenté alors que ceux aux aminosides et des pénicillines ont diminué en 10 ans.

² Poids de l'animal sur pied à jeun depuis la veille

Tableau 3: Comparaison des consommations en antibiotiques de ville dans plusieurs pays européens. Dose Définie Journalière par 1000 habitants et par jour (DDJ/1000H/J) [Affsaps, 2011].

	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
Allemagne (données ESAC)	13,6	13,6	12,8	12,7	13,9	13,0	14,6	13,6	14,5	14,5	14,9
Belgique (données ESAC)	26,2	25,3	23,7	23,8	23,8	22,7	24,3	24,2	25,4	27,7	27,5
Bulgarie (données ESAC)	15,1	20,2	22,7	17,3	15,5	16,4	18,0	18,1	19,8	20,6	18,6
Espagne (données ESAC)	20,0	19,0	18,0	18,0	18,9	18,5	19,3	18,7	19,9	19,7	19,7
France (données Afssaps)	34,3	33,4	33,0	32,2	28,9	27,1	28,9	27,9	28,6	28,0	29,6
Grèce (données ESAC)	30,7	31,7	31,8	32,8	33,6	33,0	34,7	41,1	43,2	45,2	38,6
Italie (données ESAC)	24,5	24,0	25,5	24,3	25,6	24,8	26,2	26,7	27,6	28,5	28,7
Pays-Bas (données ESAC)	10,0	9,8	9,9	9,8	9,8	9,7	10,5	10,8	11,0	11,2	11,4
Pologne (données ESAC)	22,2	22,6	24,8	21,4	n.d.	19,1	19,6	n.d.	22,2	20,7	23,6
République tchèque (données ESAC)	18,6	n.d.	n.d.	13,9	16,7	15,8	17,3	15,9	16,8	17,4	18,4
Royaume Uni (données ESAC)	14,8	14,3	14,8	14,8	15,1	15,0	15,4	15,3	16,5	16,9	17,3
Suède (données ESAC)	15,8	15,5	15,8	15,2	14,7	14,5	14,9	15,3	15,5	14,6	13,9

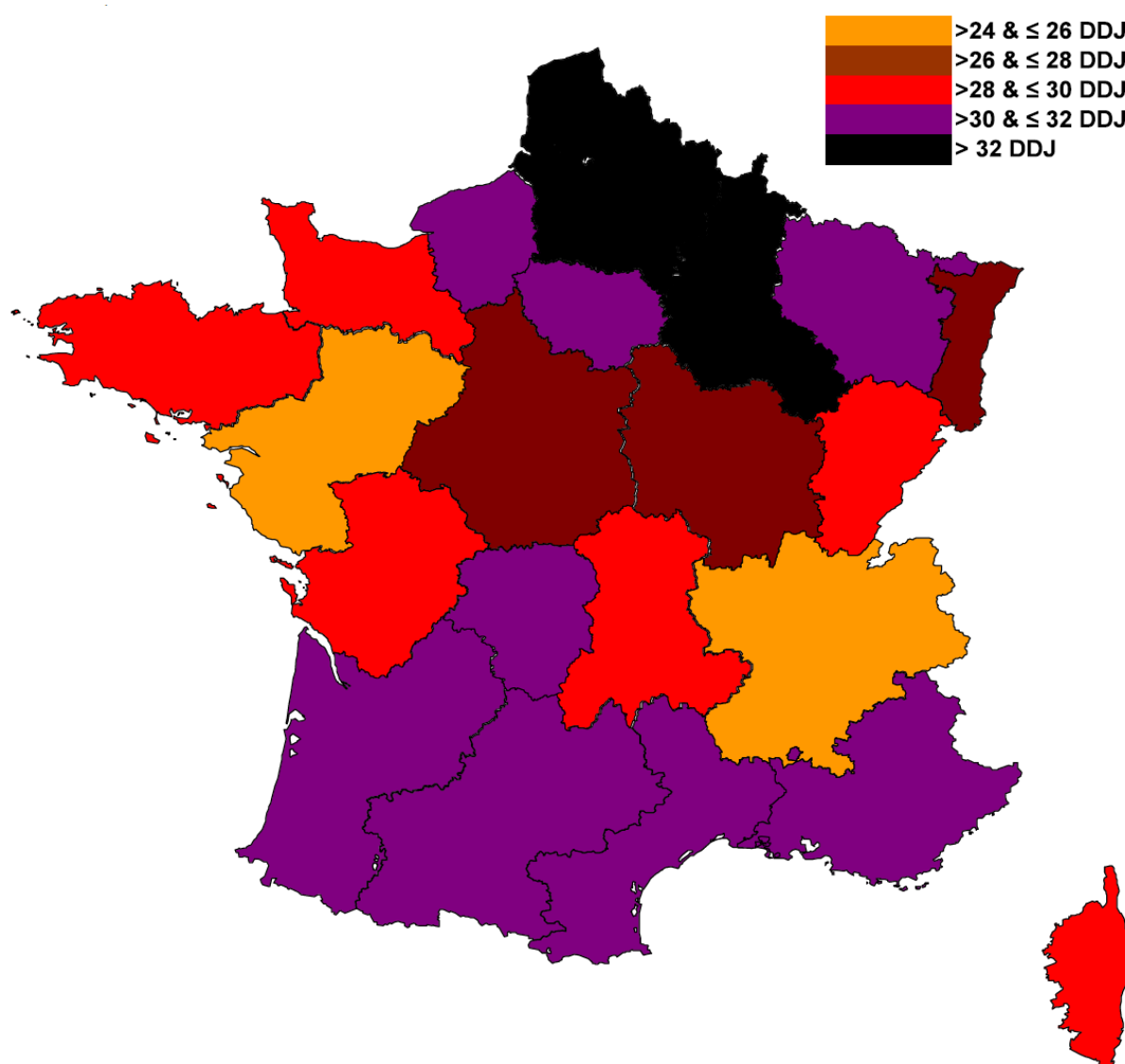


Figure 2: Répartition des consommations en antibiotiques dans les régions de France métropolitaine [Afsaps, 2011].

Tableau 4: Evolution de la consommation des principales classes d'antibiotiques utilisés à l'hôpital (classification ATC) en Dose Définie Journalière par 1000 habitants et par jour (DDJ/1000H/J) [Affsaps, 2011].

Classe ATC	1999	2002	2005	2007	2008	2009	% variation moyenne annuelle
J01C - Bêta-lactamines, Pénicillines	1,54	1,48	1,33	1,16	1,24	1,23	-2,2%
dont J01CA - Pénicillines à large spectre	0,70	0,54	0,46	0,40	0,43	0,41	-5,1%
dont J01CR - Association de pénicillines	0,72	0,85	0,79	0,68	0,74	0,74	0,3%
dont J01CR04 - Amoxicilline et inhibiteur d'enzyme	0,67	0,82	0,77	0,66	0,72	0,71	0,6%
dont J01CR05 - Pipéracilline et inhibiteur d'enzyme	0,01	0,02	0,02	0,02	0,02	0,03	6,6%
J01D - Autres bêta-lactamines	0,34	0,28	0,28	0,24	0,23	0,27	-2,5%
dont J01DB - Céphalosporines de 1ère génération	0,24	0,08	0,05	0,05	0,05	0,05	-13,9%
dont J01DC - Céphalosporines de 2ème génération	0,03	0,06	0,03	0,02	0,02	0,03	-2,9%
dont J01DD - Céphalosporines de 3ème génération	0,07	0,13	0,18	0,14	0,13	0,16	8,8%
dont J01DH - Carbapénems	0,01	0,02	0,02	0,02	0,02	0,03	6,6%
J01E - Sulfamides et triméthoprim	0,07	0,04	0,05	0,05	0,04	0,05	-3,3%
J01F - Macrolides	0,20	0,18	0,14	0,14	0,13	0,13	-4,2%
J01G - Aminosides	0,10	0,11	0,07	0,06	0,06	0,06	-5,0%
J01M - Quinolones	0,32	0,34	0,35	0,43	0,31	0,32	-0,1%
J01R+J01X - Associations et autres antibactériens	0,17	0,12	0,14	0,13	0,13	0,13	-2,5%
Autres classes	0,04	0,13	0,03	0,03	0,03	0,03	-3,9%
Total (nombre DDJ/1000H/J)	2,8	2,7	2,4	2,2	2,2	2,2	-2,3%

2. Devenir des résidus médicamenteux dans les environnements aquatiques

Dans les environnements aquatiques, six catégories de résidus médicamenteux sont principalement retrouvées : (i) analgésiques et anti-inflammatoires, (ii) antibiotiques, (iii) régulateurs de lipides, (iv) anti-épileptiques, anti-cancéreux, anti-dépresseurs, (v) β -bloquants, (vi) stéroïdes et dérivés hormonaux [Nikolaou *et al.*, 2007]. La contamination des environnements aquatiques par les molécules les plus consommées et correspondant aux 3 premières catégories ont fait l'objet de nombreuses études dans les eaux usées, eaux souterraines, eaux de surface ou eaux potables [Revue Santos *et al.*, 2010]. En 1991, Hollis évalue la vulnérabilité des eaux de surface à la contamination chimique par des pesticides en discriminant 4 classes de molécules en fonction de leur temps de demi-vie (DT_{50}) dans l'eau : non persistantes ($DT_{50} < 5$ jours), peu persistantes ($DT_{50} = 5 - 21$ jours), persistantes ($DT_{50} = 22 - 60$ jours), très persistantes ($DT_{50} > 60$ jours). Cette classification a ensuite été adaptée pour les résidus médicamenteux dans l'eau.

2.1. Origine et sources de contamination

L'origine de la contamination de l'environnement par des résidus médicamenteux est la conséquence des usages en médecine humaine et des pratiques vétérinaires, en fonction des législations en vigueur. Une fois consommées, ces molécules sont excrétées sous formes peu métabolisées via l'urine et les matières fécales [Christian *et al.*, 2003]. Par la suite, la contamination des eaux de surface s'effectuera par des effluents traités de stations d'épurations (sources ponctuelles) ou des ruissellements et/ou lessivages des sols (sources diffuses) (Figure 3). L'occurrence de résidus médicamenteux dans les sources diffuses dépendra alors de l'usage des sols (pâturage, épandage, zone urbanisée) du bassin versant³ et de la pluviométrie, elle-même dépendante des caractéristiques climatiques de la zone étudiée. La contamination par des effluents de stations d'épurations (STEPs) sera fonction de la capacité, du type de traitements des eaux usées, et leur capacité à traiter des apports importants d'effluents non traités lors d'événements orageux (réseau non séparatif). A ces deux types de sources peuvent s'ajouter des rejets non maîtrisés ou accidentels d'usines de production de produits pharmaceutiques et des connexions éventuelles aux piscicultures [Jiménez *et al.*, 2012].

³ Portions de territoire délimitées par des lignes de crêtes où tous les écoulements aboutissent vers le même exutoire

Tableau 5 : Evolution du poids vif traité par famille d'antibiotiques entre 1999 et 2010 pour l'espèce bovine [ANSES, 2010].

	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Aminoglycosides	487 137	495 094	476 431	452 698	426 053	412 795	410 910	413 121	400 945	393 556	287 522	308 164
Céphalosporines 1&2G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Céphalosporines 3&4G	135 746	166 163	163 265	187 766	206 758	213 777	245 523	262 937	274 506	303 787	245 758	301 021
Divers	31 512	29 340	22 759	21 935	21 761	20 091	17 985	16 484	16 379	16 425	12 953	12 844
Fluoroquinolones	89 974	93 665	134 552	166 670	188 855	169 905	184 730	210 589	190 385	197 941	186 472	222 391
Lincosamides	21 849	22 197	20 754	22 305	22 823	24 272	25 101	24 771	24 111	22 882	20 553	15 099
Macrolides	464 493	484 054	488 927	522 970	509 376	478 793	518 240	510 524	427 463	523 737	512 461	543 957
Pénicillines	650 045	659 150	649 945	608 202	572 595	549 514	571 521	581 443	538 181	513 806	443 806	538 589
Phénicolés	106 775	115 972	110 448	138 904	106 672	121 515	116 312	151 054	146 273	123 627	105 249	117 273
Pleuromutilines	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Polypeptides	307 269	321 931	338 373	356 319	338 659	314 207	331 286	333 815	306 546	311 393	307 367	268 680
Quinolones	38 031	38 514	41 805	50 353	47 839	40 729	48 629	49 398	37 725	27 372	28 334	34 585
Sulfamides	136 714	151 643	144 200	138 001	123 533	129 874	124 085	122 016	142 944	146 768	118 274	118 808
Tétracyclines	813 843	778 908	717 528	740 573	805 310	995 556	1 124 362	1 048 608	1 040 730	833 816	855 252	926 940
Triméthoprine	64 635	61 761	61 643	65 044	57 662	60 657	59 242	56 851	57 006	63 089	59 813	54 817
En tonnes de poids vif traité	2 655 506	2 720 793	2 710 094	2 848 265	2 845 542	2 965 550	3 220 107	3 222 301	3 054 946	2 941 717	2 766 209	3 025 064

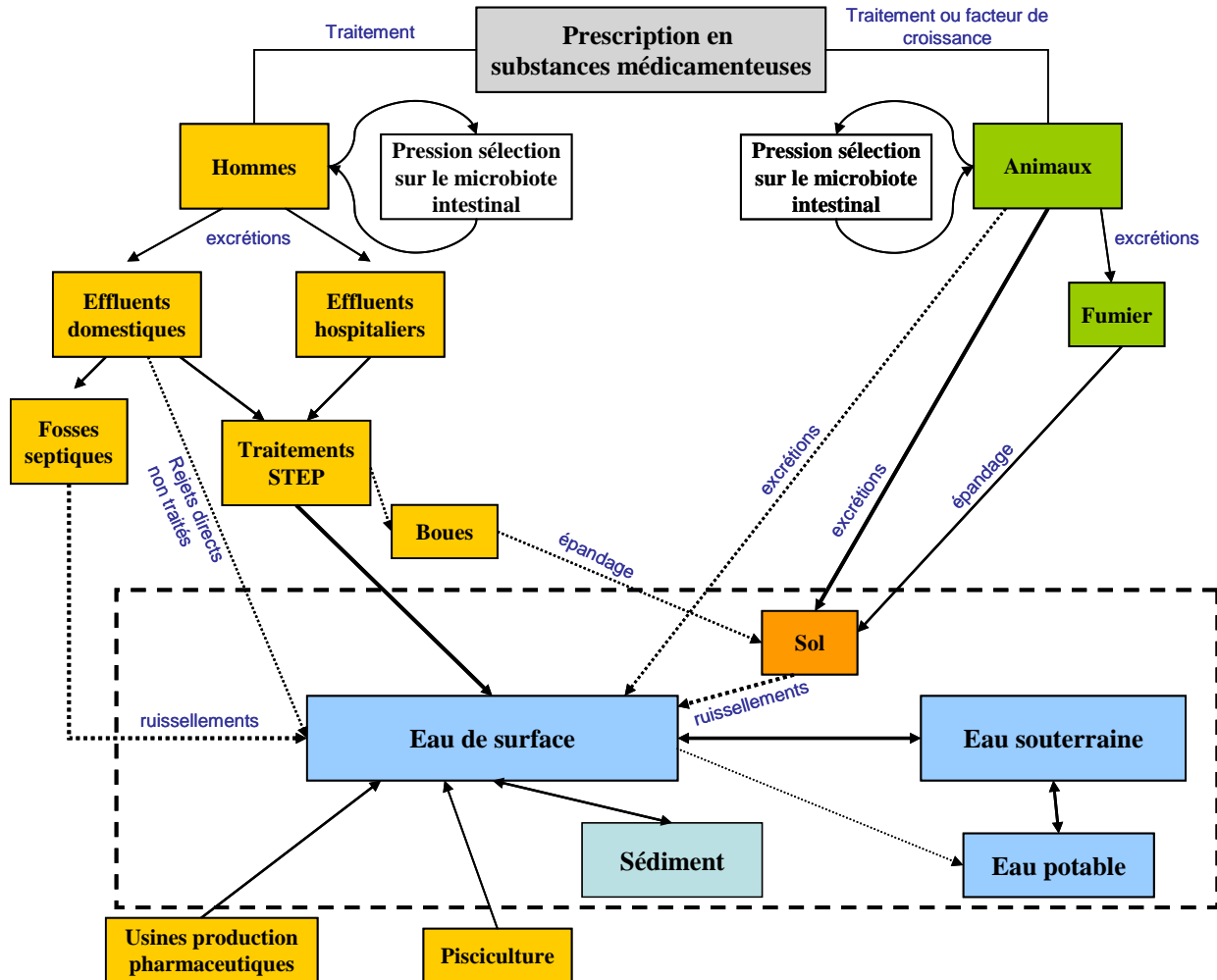


Figure 3: Schéma des sources possibles et des voies de contamination des substances médicamenteuses dans les environnements aquatiques. L'épaisseur des flèches est fonction de l'importance des contributions en contaminants à l'environnement.

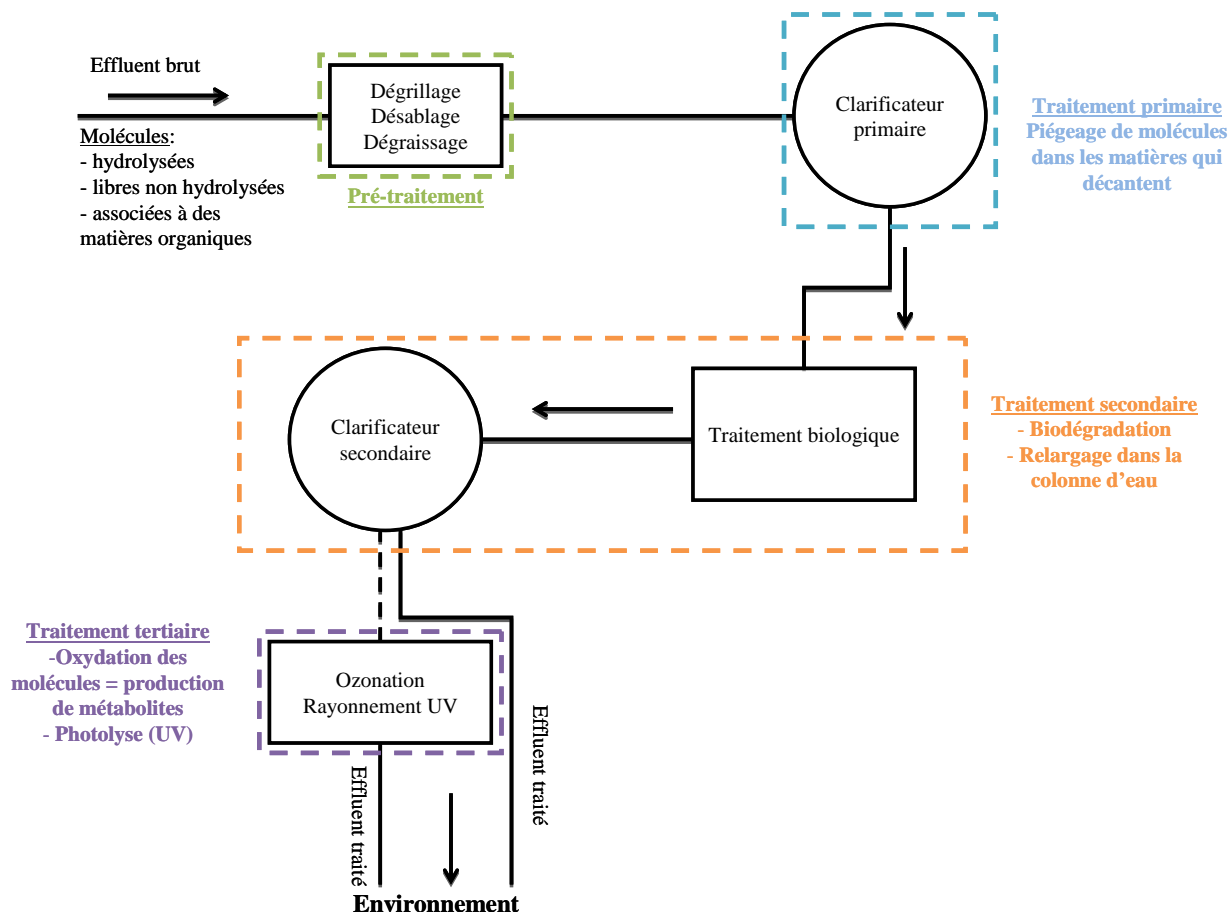


Figure 4: Schéma des traitements des effluents bruts dans une station d'épuration, et processus responsables de la dégradation ou du piégeage des résidus médicamenteux pour chaque étape. Selon les STEP, le traitement tertiaire n'est pas toujours réalisé.

2.2. Impact des rejets de stations d'épurations

Dans les STEP, le devenir des résidus médicamenteux est dépendant de différents paramètres : la température, le pH, la biodégradation ou encore le temps de rétention solide qui correspond à la durée moyenne des boues activées dans le système [Radjenović *et al.*, 2009]. Les traitements exercés sur les eaux usées dans les stations d'épurations sont à l'origine de plusieurs processus qui influencent le devenir des résidus médicamenteux : photolyse, adsorption, isomérisation/épimérisation, hydrolyse, biodégradation. Avant son entrée dans une station d'épuration, une molécule pourra être hydrolysée (*i.e* β -lactamines), non associée (*i.e* quinolones, fluoroquinolones) ou associée à des matières organiques (macrolides, tétracyclines) dans les eaux usées (Figure 4). Lors du pré-traitement et du traitement primaire, certaines molécules seront piégées dans les boues lors de la clarification des matières (*i.e* propanolol, acide méfénamique). Lors du traitement biologique, certaines molécules pourront être dégradées (*i.e* aténolol, métoprolol) et certaines seront remises en solution après dégradation de la matière organique (*i.e* macrolides après la dégradation de la bile). Lors d'un traitement tertiaire, l'ozonation induira la production de métabolites pouvant être plus toxiques que les composés initiaux (*i.e* oxytétracycline). Le traitement aux ultra-violets sera également à l'origine de la dégradation photolytique des molécules (*i.e* quinolones, fluoroquinolones).

2.3. Occurrence et persistance des résidus médicamenteux

L'évaluation de la contamination en résidus médicamenteux dépend des méthodes analytiques et des propriétés physico-chimiques qui influencent le devenir de ces molécules une fois rejetées dans l'eau. Dans la bibliographie, les variations de concentrations en résidus médicamenteux s'expliquent par l'origine de l'échantillon. Elles sont maximales à proximité des rejets de stations d'épuration (STEP) (dizaine de microgramme par litre), des effluents hospitaliers (centaine de microgramme par litre) et de rejets d'usines de production pharmaceutiques (centaine de microgramme au milligramme par litre) alors que dans les rivières, des concentrations beaucoup plus faibles sont observées, de l'ordre de la dizaine de nanogramme par litre (Tableau 6) [Larsson *et al.*, 2007 ; Li *et al.*, 2008a].

Les seuils de détection et de quantification des substances médicamenteuses reportés dans la bibliographie varient de 1ng.L^{-1} à $300\mu\text{g.L}^{-1}$ et sont dépendants du pré-traitement des échantillons (extraction en phase solide, extraction accélérée par solvant) et des méthodes analytiques utilisées [Hirsch *et al.*, 1999 ; Zuccato *et al.*, 2010 ; Miao *et al.*, 2004 ; Brown *et al.*, 2006 ; Gómez *et al.*, 2006 ; Watkinson *et al.*, 2009]. Le prélèvement (ponctuel, moyenné),

Tableau 6: Concentrations en résidus médicamenteux en fonction de l'origine de l'échantillon et de la méthode d'analyse.

Catégorie	Molécule	Echantillon	Concentration Min - Max ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Méthodologie utilisée	Référence
Analgésique / anti-inflammatoire	Diclofenac	Hôpital (75 lits)	0,06 – 1,9	LC/ESI-MS/MS	Gomez, 06
		STEP (brut)	0,9 – 1,0	HPLC/ESI-MS/MS	Roberts., 06
		STEP (traité)	0,7 – 5,5	GC - MS	Andreozzi., 03
	Ibuprofen	Hôpital (effl.)	1,5 – 151	LC/ESI-MS/MS	Gomez., 06
		STEP (brut)	7,8 – 33	HPLC/ESI-MS/MS	Roberts., 06
		STEP (traité)	0,02 – 7,11	GC-MS	Andreozzi., 03
	Paracétamol	STEP (brut)	5,5 – 69,5	HPLC-ESI-MS/MS	Roberts, 06
Antibiotiques	<i>β-lactamines</i>				
	Amoxicilline	Hôpital (-)	0,9 ^a	HPLC-MS/MS	Watkinson, 09
		Rivière (-)	0,02a	HPLC-MS/MS	Watkinson, 09
	Cloxacilline	STEP (brut)	4,6 ^a	HPLC-MS/MS	Watkinson, 09
		STEP (traité)	0,7 ^a	HPLC-MS/MS	Watkinson, 09
	<i>Sulfamides</i>				
	Sulfaméthoxazole	Hôpital (effl.)	12,8 ^a	LC-MS	Lindberg, 04
		Hôpital (effl.)	0,4 – 2,1	HPLC-MS/MS	Brown, 06
		Rivière (7)	0,04 ^a	LC-MS/MS	Tamtam, 08
	Sulfapyridine	STEP (traité)	0,02 ^a	LC/ESI-MS/MS	Miao, 04
	<i>Fluoroquinolones</i>				
	Ciprofloxacine	STEP (brut)	0,31 ^b	LC/ESI-MS	Karthikeyan, 06
		STEP (traité)	0,31 ^b	LC/ESI-MS	Karthikeyan, 06
	Ofloxacin	Hôpital (-)	7,6	LC-MS	Lindberg, 04
	<i>Tétracyclines</i>				
	Tétracycline	STEP (traité)	nd	LC-MS/MS	Hirsch, 99
		STEP (traité)	0,15	LC/ESI-MS/MS	Miao, 04
		Rivière (-)	nd	LC-MS/MS	Hirsch, 99
	<i>Macrolides</i>				
	Erythromycine	Hôpital (75 lits)	0,01– 0,03	LC/ESI-MS/MS	Gomez, 06
		STEP (brut)	0,07 – 0,1	HPLC/ESI-MS/MS	Roberts., 06
	β -bloquants	Josamycine			
Metoprolol		STEP (traité)	0,08 – 2,2	LC-MS	Andreozzi, 03
Propanolol		Hôpital (75 lits)	0,2 – 6,5	LC/ESI-MS/MS	Gomez, 06
		STEP (brut)	0,07 – 0,2	HPLC/ESI-MS/MS	Roberts, 06
		STEP (traité)	0,01 – 0,3	LC-MS	Andreozzi., 03
Anti-épileptique	Carbamazépine	Hôpital (75 lits)	0,01– 0,07	LC/ESI-MS/MS	Gomez, 06
		STEP (traité)	0,9 – 6,3	LC-MS	Andreozzi., 03
Anti-cancéreux	Ifosfamide	Hôpital (-)	nd – 1,9	GC-MS	Kümmerer, 97
		STEP (brut)	nd – 0,03	GC-MS	Kümmerer, 97
		STEP (traité)	nd – 0,04	GC-MS	Kümmerer, 97
		Rivière (-)	0,0006 – 0,001	GC-MS	Kümmerer, 10
Régulateur de lipides					
	Bezafibrate	Rivière (-)	0,05 ^b	GC-MS	Metcalfe, 03
Dérivés hormonaux					
	17- α - Ethinylestradiol	Rivière (-)	0,1 – 0,13	HPLC/ESI-MS	Brossa, 05

^a : Valeur maximale uniquement ; ^b : Valeur moyenne ; **nd** : non détecté ; (-) : nombre de lits ou ordre de rivière non déterminés

les techniques de prélèvement (seringues, seau, bouteilles), le volume prélevé, le contenant (verre, plastique), la technique de conservation (congélation, lyophilisation) et la méthode d'extraction (extraction accélérée par solvant, extraction en phase solide) sont autant de paramètres qui vont influencer l'analyse d'un échantillon [Thèse M.J Capdeville]. Au contraire, les techniques de chromatographie en phase gazeuse (GC) et en phase liquide (LC) couplées à la spectrométrie de masse simple (MS) ou en tandem (MS/MS) sont souvent utilisées quels que soient les échantillons. Néanmoins en 2004, Zwiener et Frimmel démontrent que la méthode analytique LC-MS et ses dérivées (HPLC-MS, RRLC-MS) sont plus appropriées que l'approche GC-MS pour la détection d'un grand nombre de résidus médicamenteux, y compris leurs métabolites et leurs produits de transformation.

Les substances médicamenteuses prescrites en santé humaine et animale sont majoritairement des composés organiques. La biodégradation (processus biotique) et la thermolyse, l'hydrolyse, la photolyse, l'adsorption (processus abiotiques) expliquent leur persistance dans les eaux. Ainsi, les propriétés physico-chimiques de ces molécules seront déterminantes pour comprendre leur devenir dans l'environnement aquatique. Quatre paramètres caractérisent le comportement des résidus médicamenteux dans les eaux : le coefficient de partitionnement (K_{ow}) entre l'octanol et l'eau qui évalue le caractère lipophile, la constante d'acidité (K_a), le coefficient de partage (K_{oc}) et la solubilité (Tableau 7) [Jiménez *et al.*, 2012]. Le processus d'adsorption aux particules minérales ou organiques (biofilms) est dépendant du coefficient de partage (K_{oc}), alors que la bioaccumulation dans les tissus est favorisée par un coefficient de partitionnement ($\log K_{ow}$) positif et élevé [Wunder *et al.*, 2011] (Tableaux 8 et 9).

Tableau 7: Principaux coefficients impliqués dans le devenir des résidus médicamenteux

Paramètre	Coefficient	Utilisation
Coefficient de partitionnement	$\log (K_{o/w})$	Caractère hydrophile ou lipophile d'un composé : une valeur élevée et positive correspond à un composé fortement lipophile.
Coefficient de partage	K_{oc}	Détermine la répartition d'un composé entre l'eau et un solide. Ce coefficient est dépendant des propriétés physico-chimiques du composé et de la teneur en carbone organique du solide
Solubilité	-	Concentration maximale d'un composé qui peut-être dissout ou dissocié dans un solvant (ex : eau)
Constante d'acidité	K_a	Caractérise la forme ionique du composé dans le milieu qui affectera ses propriétés d'interaction et/ou de toxicité

Tableau 8 : Coefficient de partitionnement des substances médicamenteuses à caractère lipophile

Catégorie	Classe	Molécule	Log K _{ow}	Référence	
Analgésique / anti-inflammatoire					
Antibiotique	β-lactamines	Diclofenac	1,90 4,54	Scheytt <i>et al.</i> , 2005 Chem Spider ¹	
		Ibuprofen	2,80 3,50	Scheytt <i>et al.</i> , 2005 Chem Spider ¹	
		Propyphenazone	2,02	Scheytt <i>et al.</i> , 2005	
		Paracétamol	0,48	Chem Spider ¹	
		Amoxicilline	0,62	Sci Finder ²	
		Ampicilline	1,35	Sci Finder ²	
		Cloxacilline	2,53	Sci Finder ²	
		Dicloxacilline	3,02	Sci Finder ²	
		Oxacilline	2,05	Sci Finder ²	
		Pénicilline V	1,87	Sci Finder ²	
	Pénicilline G	1,67	Sci Finder ²		
	Cefotaxime	1,20	Sci Finder ²		
	Cefpodoxime	0,94	Sci Finder ²		
	Sulfamides	Sulfaméthoxazole	0,89	Sci Finder ²	
		Sulfapyridine	0,03	Sci Finder ²	
		Sulfadiméthoxine	1,48	Sci Finder ²	
	Fluoroquinolones	Ciprofloxacin	1,31	Sci Finder ²	
		Difloxacin	3,68	Sci Finder ²	
	Tétracyclines	Mélocycline	0,24	Sci Finder ²	
	Macrolides	Oléandomycine	1,23	Sci Finder ²	
		Josamycine	3,97	Sci Finder ²	
		Phénicol	Chloramphénicol	1,08	Sci Finder ²
	Metoprolol		1,79	Sci Finder ²	
	Propanolol		3,10	Sci Finder ²	
	Bisoprolol		2,14	Sci Finder ²	
	β-bloquants				
	Anti-épileptique				
Anti-cancéreux		Carbamazépine	1,51	Scheytt <i>et al.</i> , 2005	
		Ifosfamide	0,23	Sci Finder ²	
		Tamixofen	7,89	Sci Finder ²	
Anti-rétroviraux	Inhibiteur nucléosidique	Abacavir	0,72	Sci Finder ²	
	Inhibiteur non nucléosidique	Efavirenz	4,84	Sci Finder ²	
		Ritonavir	5,28	Sci Finder ²	
Dérivés hormonaux					
		β-estradiol	4,15	Chem Spider ¹	

¹ <http://www.cas.org>² <http://www.chemspider.com>

Tableau 9 : Coefficient de partitionnement des substances médicamenteuses à caractère hydrophile.

Catégorie	Classe	Molécule	Log K _{ow}	Référence
Antibiotique	<i>β-lactamines</i>	Méropènème	-3,13	Sci Finder
	<i>Sulfamides</i>	Sulfacétamide	-0,96	Sci Finder
		Sulfadiazine	-0,12	Sci Finder
		Sulfanilamide	-0,72	Sci Finder
	<i>Tétracyclines</i>	Tétracycline	-1,47	Sci Finder
		Oxytétracycline	-1,50	Sci Finder
		Doxycycline	-0,54	Sci Finder
		Chlortétracycline	-0,32	Sci Finder
	<i>Aminosides</i>	Amikacine	-3,34	Sci Finder
		Kanamycine	-2,58	Sci Finder
		Streptomycine	-2,53	Sci Finder
Anti-cancéreux	<i>Phénicol</i>	Florfénicol	-0,12	Sci Finder
		Thiamphénicol	-0,27	Sci Finder
Anti-rétroviraux	<i>Inhibiteur nucléosidique</i>	Fluorouracile	-0,78	Sci Finder
		Zalcitabine	-1,30	Sci Finder
		Didanosine	-1,33	Sci Finder
		Stavudine	-0,86	Sci Finder

Tableau 10: Processus de dégradation et temps de demi-vie ($T_{1/2}$) des antibiotiques dans les environnements aquatiques.

Famille	Molécule	Processus de dégradation du composé					$T_{1/2}$ (min)	Conditions expérimentales	Référence
		Photolyse	Hydrolyse	Adsorption	Biodégradation	Thermolyse			
Fluoroquinolones	Ciprofloxacin	++	-	NA	-	-	1,80 ^a – 8,82 ^b	Microcosme	Ge <i>et al.</i> , 10
		NA	NA	+	-	NA	NA	Microcosme	Githinji <i>et al.</i> , 10
		NA	NA	+	NA	NA	NA	<i>In situ</i>	Giger <i>et al.</i> , 03
		NA	NA	+	-	NA	NA	Microcosme (Biofilm)	Wunder <i>et al.</i> , 11
	Ofloxacin	NA	NA	+	NA	NA	4896 ^c – 18576 ^d	Microcosme	Xu <i>et al.</i> , 09
	Danofloxacin	++	-	NA	-	-	1,76 ^a – 7,84 ^b	Microcosme	Ge <i>et al.</i> , 10
	Levofloxacin	+	-	NA	-	-	8,94 ^a – 42,2 ^b	Microcosme	Ge <i>et al.</i> , 10
	Norfloxacin	NA	NA	+	NA	NA	NA	<i>In situ</i>	Giger <i>et al.</i> , 03
	Sarafloxacin	++	-	NA	-	-	2,34 ^a – 11,5 ^b	Microcosme	Ge <i>et al.</i> , 10
	Difloxacin	++	-	NA	-	-	2,22 ^a – 10,5 ^b	Microcosme	Ge <i>et al.</i> , 10
	Enrofloxacin	++	-	NA	-	-	1,25 ^a – 6,11 ^b	Microcosme	Ge <i>et al.</i> , 10
		++	NA	NA	NA	NA	NA	Microcosme	Knapp <i>et al.</i> , 05
Sulfamides	Gatifloxacin	+	-	NA	-	-	11,0 ^a – 51,8 ^b	Microcosme	Ge <i>et al.</i> , 10
	Balofloxacin	+	-	NA	-	-	12,5 ^a – 58,0 ^b	Microcosme	Ge <i>et al.</i> , 10
	Sulfaméthazine	NA	NA	+/-	NA	NA	NA	Microcosme	Gao et Pedersen, 05
	Sulfaméthoxazole	NA	NA	+/-	NA	NA	NA	Microcosme	Gao et Pedersen, 05
		NA	NA	+	NA	NA	21168 ^c – 20880 ^d	Microcosme	Xu <i>et al.</i> , 09
	Sulfapyridine	NA	NA	+/-	NA	NA	NA	Microcosme	Gao et Pedersen, 05
β -lactamines	Amoxicilline	NA	++	NA	+/-	NA	NA	Microcosme	Längin <i>et al.</i> , 09
		NA	NA	+/-	-	NA	NA	Microcosme	Githinji <i>et al.</i> , 10
	Piperacilline	NA	++	NA	-	NA	NA	Microcosme	Längin <i>et al.</i> , 09
	Pénicilline G	NA	NA	NA	+/-	NA	NA	Microcosme	Al-Ahmad <i>et al.</i> , 99
Macrolides	Roxithromycine	NA	NA	+	NA	NA	9648 ^c – 41760 ^d	Microcosme	Xu <i>et al.</i> , 09
	Erythromycine	NA	NA	+	NA	NA	10512 ^c – 25920 ^d	Microcosme	Xu <i>et al.</i> , 09
	Azithromycine	+	NA	NA	NA	NA	NA	<i>In situ</i> / Microcosme	Tong <i>et al.</i> , 11
Tétracyclines	Tetracycline	NA	NA	+	-	NA	NA	Microcosme	Kim <i>et al.</i> , 05
	Chlorotétracycline	NA	NA	+	-	NA	NA	Microcosme	Kim <i>et al.</i> , 05
	Doxycycline	NA	NA	+	-	NA	NA	Microcosme	Kim <i>et al.</i> , 05
	Oxytétracycline	NA	NA	+	-	NA	NA	Microcosme	Kim <i>et al.</i> , 05

^a période estivale; ^b période hivernale; ^c condition dynamique; ^d non dynamique; ++, +, +/- : intensité du processus de dégradation ; - : absence de dégradation ; NA : non analysé

2.4. Devenir des antibiotiques

Dans les environnements aquatiques, le devenir des antibiotiques est différent selon la famille de molécules. Des études *in situ* et des expérimentations en microcosme (eaux, sédiments) ont permis d'identifier cinq processus responsables de la dégradation et/ou de l'élimination des molécules d'antibiotiques: biodégradation, thermolyse, hydrolyse, adsorption et photolyse (Tableau 10). Ce dernier processus étant amplifié en présence d'acides humiques jouant un rôle de photosensibilisateurs [Tong *et al.*, 2011]. L'adsorption est le processus qui permettra l'association des résidus d'antibiotiques aux particules et ainsi leur accumulation dans les sédiments ou le piègeage dans les boues activées.

2.4.1. Les β -lactamines

La famille des β -lactamines sont des molécules naturelles ou hémi-synthétiques qui inhibent la synthèse de la paroi bactérienne [Kohanski *et al.*, 2010]. Dans l'eau, cette famille d'antibiotiques est rarement détectée, l'hydrolyse étant responsable de leur dégradation et leur perte d'activité (Tableau 10) [Längin *et al.*, 2009]. Les produits d'hydrolyse (*i.e* amoxicilline) pourront être transformés par biodégradation (clivage du groupement phénol) pour ensuite être biominéralisés (Figure 5). Toutefois, une autre voie de transformation de l'amoxicilline impliquant une hydrolyse et des réactions d'épimérisation, générant quatre produits de dégradation, serait possible lors du traitement des eaux usées de stations d'épurations [Pérez-Parada *et al.*, 2011] (Figure 6). Lors de ces traitements, une faible proportion de molécules s'adsorbe aux boues activées. Ainsi, dans les eaux usées, des expérimentations en microcosme ont démontré que seules 4% des molécules d'amoxicilline s'adsorbaient aux argiles, aux composés organiques (*e.g* tryptone) et aux cations divalents (magnésium, zinc) quelle que soit la valeur de pH [Githinji *et al.*, 2010].

2.4.2. Les sulfamides

La famille des sulfamides sont des molécules synthétiques qui inhibent la synthèse de l'acide tétrahydrofolique, molécule précurseur de la synthèse de l'ADN [Kohanski *et al.*, 2010]. Une fois consommées, les sulfamides sont excrétées par l'organisme sous forme non altérée ou acétylée [Göbel *et al.*, 2005]. Lors des traitements biologiques des STEP, ces métabolites acétylés pourront à nouveau être transformés en molécules « mère » [Göbel *et al.*, 2007]. Ce phénomène explique la grande variabilité des concentrations en sulfaméthoxazole observées entre l'entrée et la sortie d'une STEP par Göbel *et al.* (2007).

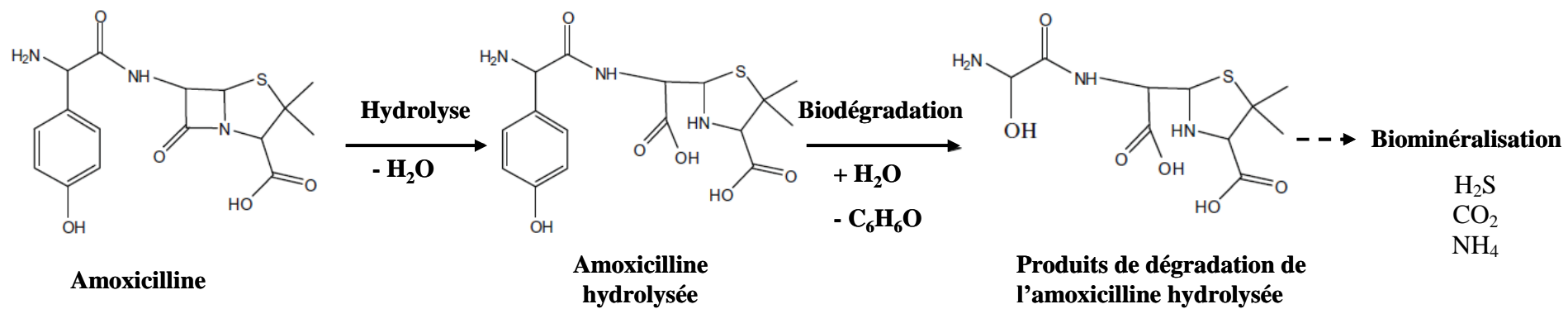


Figure 5 : Voie de transformation potentielle de l'amoxicilline [adaptée de Längin *et al.*, 2009].

L'adsorption dans l'eau est le processus le plus étudié pour la famille des sulfamides, molécules non hydrolysées dans l'eau (Tableau 10). L'adsorption de la sulfaméthazine, sulfaméthoxazole, sulfapyridine sur deux argiles (Montmorillonite et kaolinite) est contrôlée par le pH, la force ionique, et la densité de charge de la molécule et à la surface de la particule [Gao et Pedersen, 2005]. En utilisant un canal annulaire simulant les processus de dépôt/érosion, Xu *et al* (2009) ont montré qu'une grande quantité de sulfaméthoxazole était libérée dans la phase aqueuse, due à son faible coefficient de partage (K_{oc}), expliquant une meilleure affinité pour l'eau de cette molécule [Kümmerer, 2009 ; Massey *et al.*, 2010].

2.4.3. Les tétracyclines

Les tétracyclines sont des molécules naturelles et hémi-synthétiques qui inhibent la traduction en se fixant sur la sous-unité 30S du ribosome [Kohanski *et al.*, 2010]. L'adsorption est le processus majoritaire qui influence le devenir de cette famille de molécules (Tableau 10). Les tétracyclines ont des propriétés importantes d'adsorption et peuvent se complexer avec les cations divalents, Ca^{2+} et Mg^{2+} . Toutefois, les acides humiques peuvent altérer leurs propriétés de surface et inhiber ce processus [Christian *et al.*, 2003]. Lorsque le pH est modifié, la spéciation des tétracyclines change et engendre une désorption des résidus qui deviennent à nouveau biodisponibles (Figure 7). Dans une étude en microcosme, la faible bioaccumulation de l'oxytétracycline dans les moules (*Mytilus edulis*) indique que cet antibiotique s'adsorbe peu aux tissus, en raison de son caractère hydrophile déterminé par sa valeur de coefficient de partitionnement ($\log K_{ow}$) [Le Bris et Pouliquen, 2004].

Dans les stations d'épurations, l'élimination de cette famille de molécules est fonction du temps de rétention solide et de la température. Pour un temps de rétention de 14h, la concentration en oxytétracycline est diminuée de 38%, consécutive à une dégradation en α -apo-oxytétracycline et β -apo-oxytétracycline générée lors de l'ozonation [Li *et al.*, 2008a]. Une étude en bioessai chez *Vibrio fischeri* a montré une toxicité plus élevée de ces molécules [Li *et al.*, 2008b].

2.4.4. Les quinolones et fluoroquinolones

Les quinolones (1^{ère} génération) et fluoroquinolones (quinolones de 2^e et 3^e générations) sont des molécules synthétiques qui se fixent sur l'ADN gyrase, enzyme essentielle pour la synthèse de l'ADN [Kohanski *et al.*, 2010]. Les quinolones/fluoroquinolones, composés stables, sont des contaminants ubiquitaires de l'eau de surface [Hirsch *et al.*, 1999 ; Lindberg *et al.*, 2004 ; Brown *et al.*, 2006 ; Watkinson *et al.*,

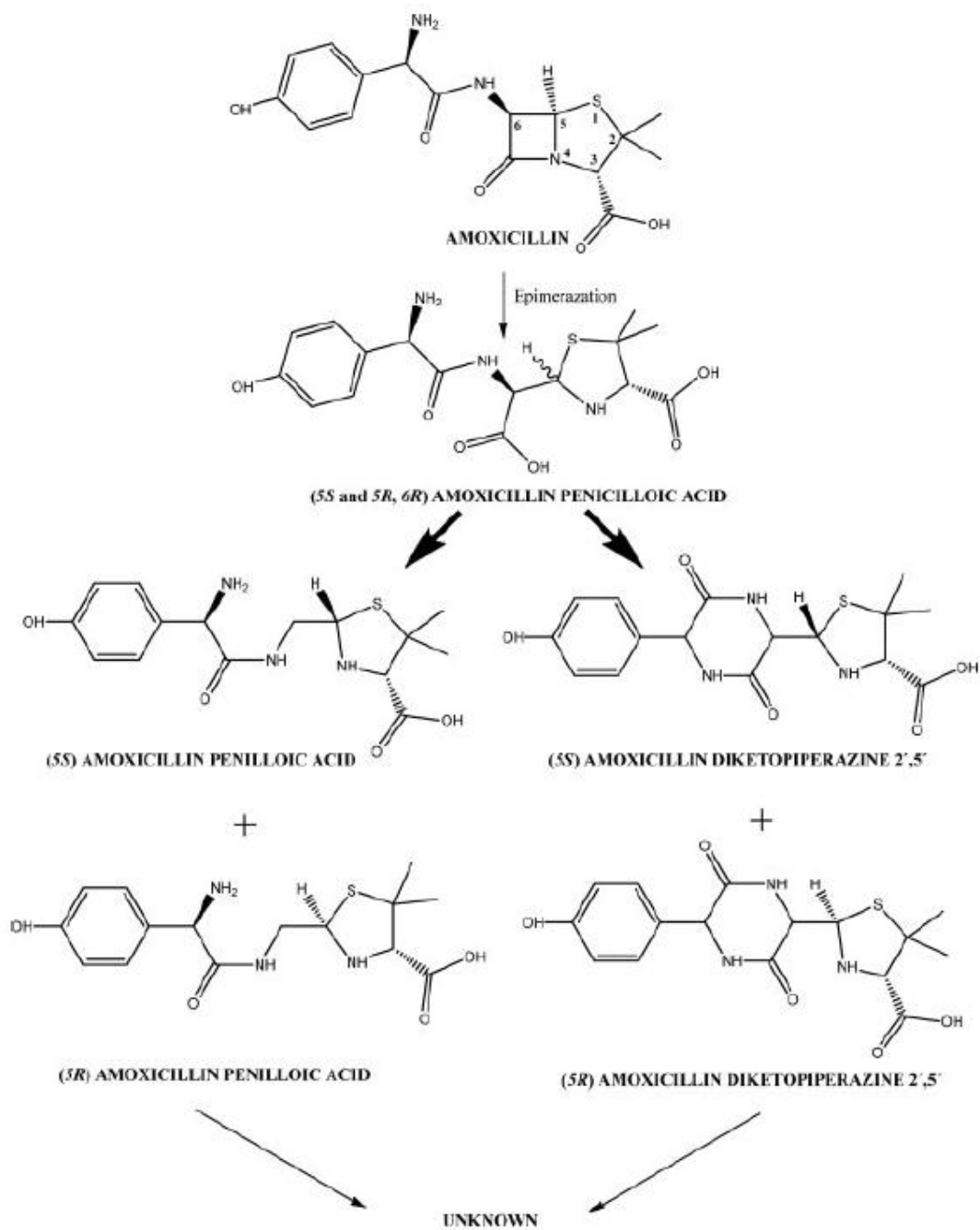


Figure 6 : Voies majoritaires de transformations potentielles de l'amoxicilline après hydrolyse [d'après Pérez-Parada *et al.*, 2011].

2009]. La plus grande stabilité des quinolones/fluoroquinolones dans l'eau comparée aux autres familles d'antibiotiques s'explique par une absence de biodégradation. Ainsi, une étude en microcosme démontre que la ciprofloxacine reste stable en présence de bactéries du genre *Rhodococcus* spp⁴ [Githinji *et al.*, 2010]. Dans la zone euphotique de l'eau, la photolyse sera le processus majoritairement impliqué dans la dégradation de ces composés (Tableau 10). Toutefois, la réaction de photolyse sera partiellement ou totalement inhibée en fonction de la concentration en acides humiques, en carbone organique dissous et particulaire, en ions chlorure, ferriques ou bromures [Ge *et al.*, 2010 ; Knapp *et al.*, 2005].

Dans l'environnement aquatique, l'adsorption est un processus déterminant sur le devenir des quinolones/fluoroquinolones. La spéciation (Figure 8) et la structure de ces molécules favorisent l'adsorption aux biofilms comme le démontre une étude sur la ciprofloxacine en bioréacteur [Wunder *et al.*, 2011]. Dans des rivières impactées par des rejets de stations d'épurations, les quinolones (ciprofloxacine, ofloxacine) sont non seulement détectées dans l'eau mais aussi dans les sédiments à des concentrations élevées [Massey *et al.*, 2010]. Les valeurs de coefficients de partage (K_{oc}) élevées expliquent la forte adsorption des composés aux particules (de 233L.Kg⁻¹ à 5548L.Kg⁻¹). Des expériences menées en canal annulaire simulant les processus de dépôt/érosion à l'interface eau-sédiment ont permis d'étudier la distribution de l'ofloxacine entre ces deux compartiments en conditions dynamique et quiescente (non dynamique). Xu *et al.* (2009) montre que l'adsorption des antibiotiques aux sédiments est un processus rapide (30 min). La concentration en ofloxacine dans le sédiment évolue de 0 ng.g⁻¹ (t_0) à 3,7 µg.g⁻¹ (t_{30}) en condition dynamique et 1,9 µg.g⁻¹ en condition quiescente. L'ofloxacine est retrouvée jusqu'à environ 3 cm de profondeur dans le sédiment où elle persiste avec un temps de demi-vie de 21,4 jours. Les quinolones/fluoroquinolones, qualifiées de contaminants persistants selon la classification de Hollis (1991), ont été détectées dans une carotte sédimentaire d'un fleuve fortement anthropisé (Seine, France) qui datent de 50ans [Tamtam *et al.*, 2011]. Dans les STEPs, la photolyse par les traitements ultra-violets et l'adsorption lors des traitements des eaux usées seront les deux processus majeurs impliqués dans la dégradation et/ou élimination par piégeage dans les boues de ces composés (Tableau 10).

⁴ Genre bactérien majoritairement utilisé pour les tests de biodégradation de molécules

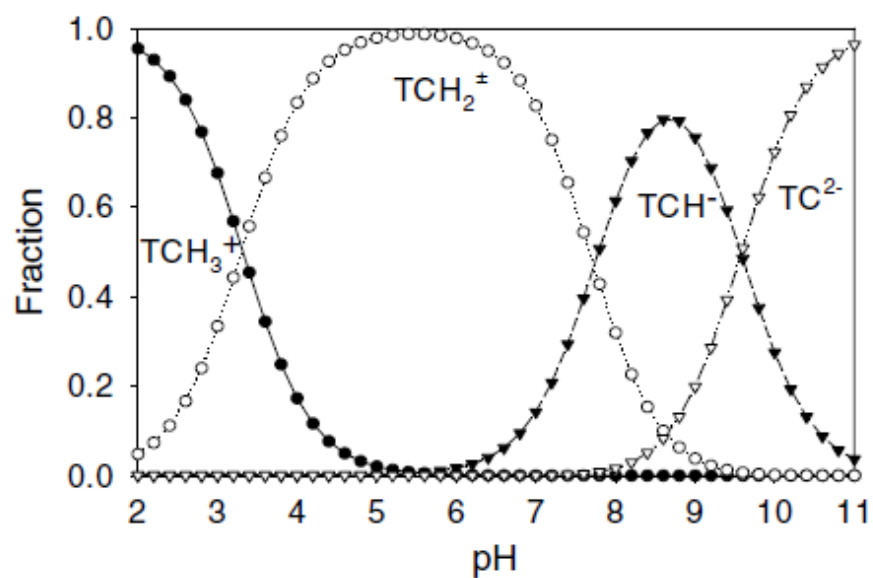


Figure 7 : Spéciation de la tétracycline en fonction du pH [d'après Gu *et al.*, 2007].

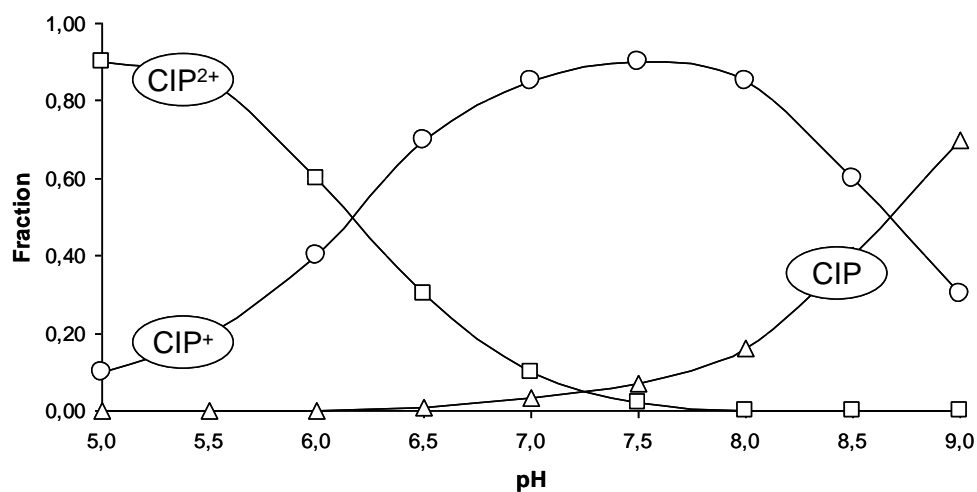


Figure 8: Spéciation des molécules de ciprofloxacine en fonction du pH [d'après Wunder *et al.*, 2011].
 CIP^+ , CIP^{2+} : formes cationiques de la ciprofloxacine.

En absence de photolyse, l'adsorption devient le processus majoritaire sur l'élimination de la ciprofloxacine [Githinji *et al.*, 2011]. L'adsorption de cette molécule aux propriétés amphotériques⁵ est maximale (8 à 16%) à pH 6, avec la perte de l'hydrogène du groupement acide carboxylique.

A pH basique, des répulsions électrostatiques avec la phase solide également chargée négativement diminuent les propriétés d'adsorption de la molécule (Figure 9). Dans les boues activées, où 80-90% de ces molécules s'accumulent, des concentrations de l'ordre du ng.kg^{-1} voire du mg.kg^{-1} sont atteintes [Zuccato *et al.*, 2010 ; Giger *et al.*, 2003 ; Golet *et al.*, 2003 ; Lindberg *et al.*, 2005].

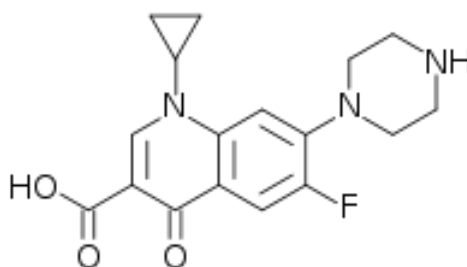


Figure 9 : Structure chimique de la ciprofloxacine comprenant un groupement carboxyle ($\text{pK}_a=6.1$) et un groupement amine ($\text{pK}_a=8.7$) dont les charges sont dépendantes du pH. La fonction acide carboxylique est photodégradable (d'après Burhenne *et al.*, 1997).

2.4.5. Les macrolides

Les macrolides sont des molécules naturelles et hémi-synthétiques inhibant l'élongation de la chaîne peptidique en se fixant sur la grande sous-unité 50S du ribosome [Kohanski *et al.*, 2010]. Dans l'eau, l'association réversible de ces molécules aux acides humiques influence la dynamique de contamination. Ainsi la forme cationique de la clarithromycine qui est complexée, peut être relarguée dans la colonne d'eau en fonction des modifications du pH [Sibley et Pedersen, 2007]. L'étude des processus de dégradation et/ou d'élimination de ces molécules dans l'eau est moins renseignée dans la bibliographie. Les macrolides, résistantes à la biodégradation bactérienne sont dégradées dans l'eau par photolyse. Cette réaction, amplifiée en présence de nitrate et d'acides humiques génère 7 produits qui présentent encore une activité anti-bactérienne (Figure 10) [Tong *et al.*, 2011].

A la différence des autres familles d'antibiotiques, dans les STEPS, des processus d'adsorption/désorption des macrolides sont responsables de concentrations plus élevées de ces molécules dans les effluents traités comparativement aux effluents bruts.

⁵ Capacité d'un composé à se comporter comme un acide ou une base

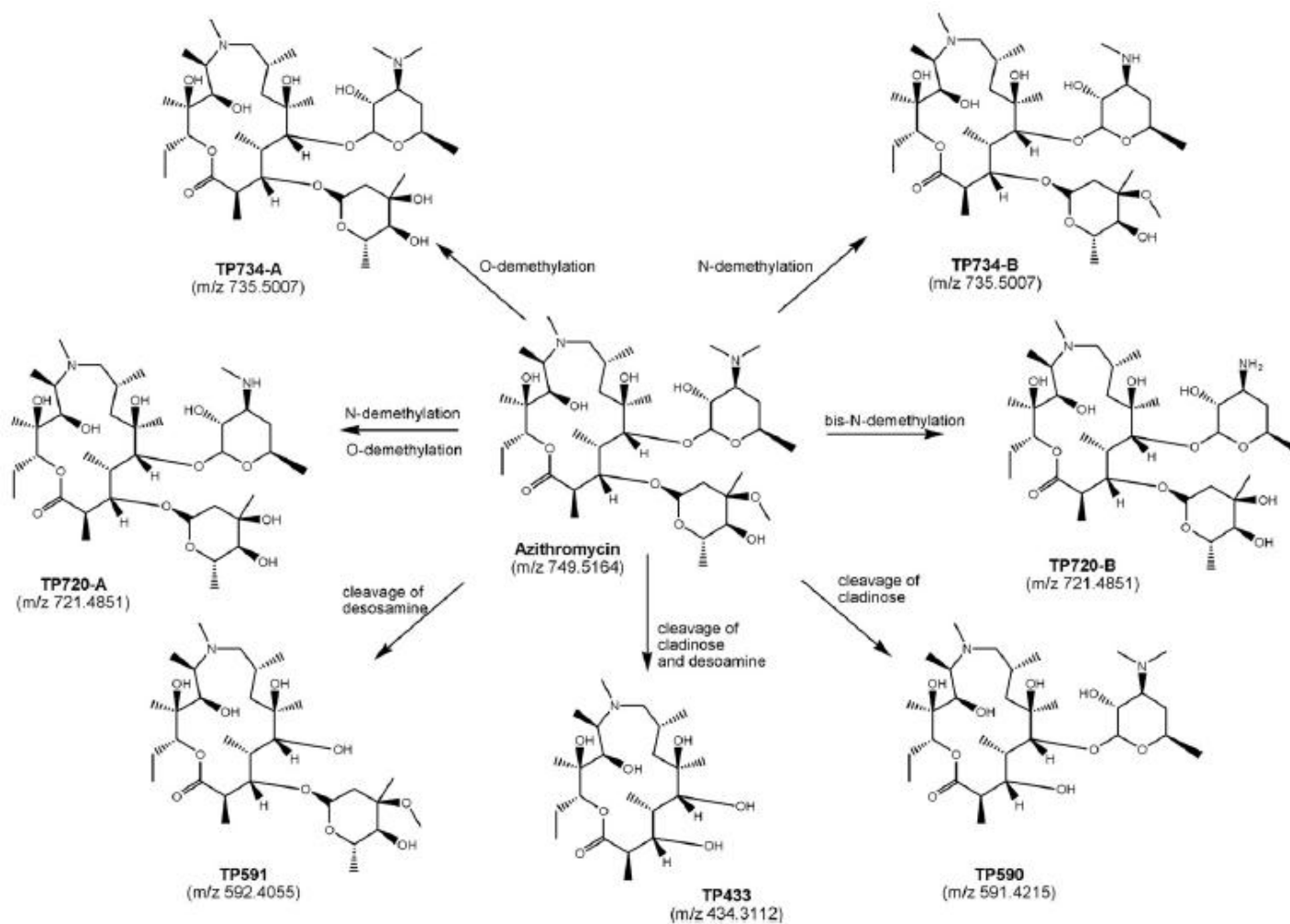


Figure 10 : Structure potentielle des produits de photolyse de l'azithromycine [d'après Tong *et al.*, 2011].

Ce phénomène de désorption indirecte s'explique par un relargage des macrolides préalablement associés à la bile et aux fèces lors de la dégradation de la matière organique, à l'étape du traitement secondaire [Göbel *et al.*, 2007].

Dans la bibliographie, le devenir des molécules appartenant à la famille des glycopeptides dans l'eau n'est pas renseigné, notamment la vancomycine, antibiotique de dernier recours aux infections de bactéries à Gram positif.

En conclusion, l'étude du devenir des résidus d'antibiotiques dans les environnements aquatiques et les stations d'épurations montre que la photolyse, par la lumière solaire ou le traitement aux ultraviolets, est le processus majoritairement impliqué dans la dégradation de ces molécules. Les produits obtenus, parfois plus toxiques que le composé initial, pourront pour certains être biodégradés jusqu'à leur minéralisation. A l'opposé de ces réactions de dégradation responsables de la disparition plus ou moins rapide d'une partie de ces molécules, les phénomènes d'adsorption auront pour effet de stabiliser ces résidus dans l'environnement par piégeage dans les boues activées de STEPs, et accumulation dans les sédiments, ou dans les organismes filtreurs (*i.e* moules).

3. Impact des antibiotiques sur l'écosystème aquatique

A l'exception des perturbateurs endocriniens, il n'a pas été démontré d'effets toxiques des résidus médicamenteux, y compris les antibiotiques, sur la physiologie de différents organismes modèles ou bio-indicateurs, aux concentrations environnementales [Revue Santos *et al.*, 2010 ; Minier *et al.*, 2000 ; Forget-Leray *et al.*, 2005]. Toutefois, par leurs actions bactéricide ou bactériostatique, la contamination des eaux et des sédiments par les antibiotiques peuvent inhiber l'activité des communautés bactériennes fonctionnelles et/ou sélectionner des souches antibio-résistantes. [Luis Campos *et al.*, 2001 ; Goh *et al.*, 2002 ; Costanzo *et al.*, 2005 ; Davies *et al.*, 2006 ; Córdova-Kreylos et Scow, 2007 ; Fajardo et Martinez, 2008].

Des expérimentations en réacteur ont montré que des concentrations 1 mg.L⁻¹ et 250 mg.L⁻¹ en antibiotiques (erythromycine, clarithromycine, amoxicilline, oxytétracycline) inhibent l'activité des communautés microbiennes nitrifiantes et dénitrifiantes [Luis Campos *et al.*, 2001 ; Costanzo *et al.*, 2005]. Dans les sédiments contaminés par des antibiotiques dans des élevages de poissons en mer, l'activité des communautés microbiennes sulfato-réductrices est inhibée pendant 29 jours et restaurée au bout de 70 jours [Hansen *et al.*, 1992].

Ce phénomène de résilience s'explique par une modification de la diversité de la communauté sulfato-réductrice. Ainsi, des concentrations de 20 mg.L^{-1} en ciprofloxacine favorisent la croissance des genres *Desulfovibrio*, *Desulfobulbus* et *Desulfobacter* [Córdova-Kreylos et Scow, 2007]. De même la dégradation du pyrène (Hydrocarbure Aromatique Polycyclique) dans des sédiments contaminés par la ciprofloxacine est inhibée de 50% pour des valeurs de $0,4 \text{ } \mu\text{g.Kg}^{-1}$ de masse sèche, les premiers effets étant observés pour des valeurs de $0,1 \text{ } \mu\text{g.Kg}^{-1}$ [Näslund *et al.*, 2008].

L'effet des antibiotiques sur l'activité des communautés microbiennes de l'environnement soulève d'autres interrogations quant à la possible sélection de souches résistantes aux antibiotiques dans l'eau. A l'exception des rejets d'usines de production pharmaceutique en Asie, les concentrations en antibiotiques observées dans les eaux sont inférieures aux concentrations minimales inhibitrices (CMI), qui varient de $0,032 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ à $256 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ [Duong *et al.*, 2008]. Il a été récemment démontré que des concentrations 100 fois inférieures à ces CMI favoriseraient le maintien et l'émergence de souches d'*E. coli* et de *Salmonella* antibio-résistantes [Gullberg *et al.*, 2011]. A des concentrations sub-inhibitrices (25% à 90% de la CMI), il a été observé un effet hormétique qui se traduit par la modulation de la réponse transcriptionnelle avec la modulation de promoteurs spécifiques (*i.e rpoS*) [Davies *et al.*, 2006]. En 2010, Kohanski *et al* mettent en évidence l'effet de ces concentrations « sub-inhibitrices » (norfloxacine, 50 ng.mL^{-1}) sur la production de radicaux libres responsables de l'émergence de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques à la suite de mutations liées à la régulation par le système SOS. Ces effets génotoxiques sont observés pour des concentrations en ciprofloxacine de l'ordre de $10 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ [Hartmann *et al.*, 1998].

4. Contamination des eaux par les bactéries fécales antibio-résistantes

En parallèle aux apports en résidus médicamenteux, il existe une contamination par des bactéries d'origine fécale antibio-résistantes dans les environnements aquatiques. Au sein des populations bactériennes et particulièrement des souches pathogènes, la présence de gènes de résistance aux antibiotiques a été reconnue comme un problème de santé publique par l'OMS (2001). Ainsi, les systèmes hydriques sont le lieu de dissémination de souches d'*Escherichia coli* et d'*Enterococcus* spp. résistantes aux antibiotiques [Watkinson *et al.*, 2007 ; Laroche *et al.*, 2009 ; Luczkiewicz *et al.*, 2010]. L'occurrence de souches d'*E. coli* et d'*Enterococcus* résistantes aux antibiotiques rejetées dans les environnements aquatiques dépendra des usages du bassin versant. Dans un fleuve fortement anthropisé (Seine, France),

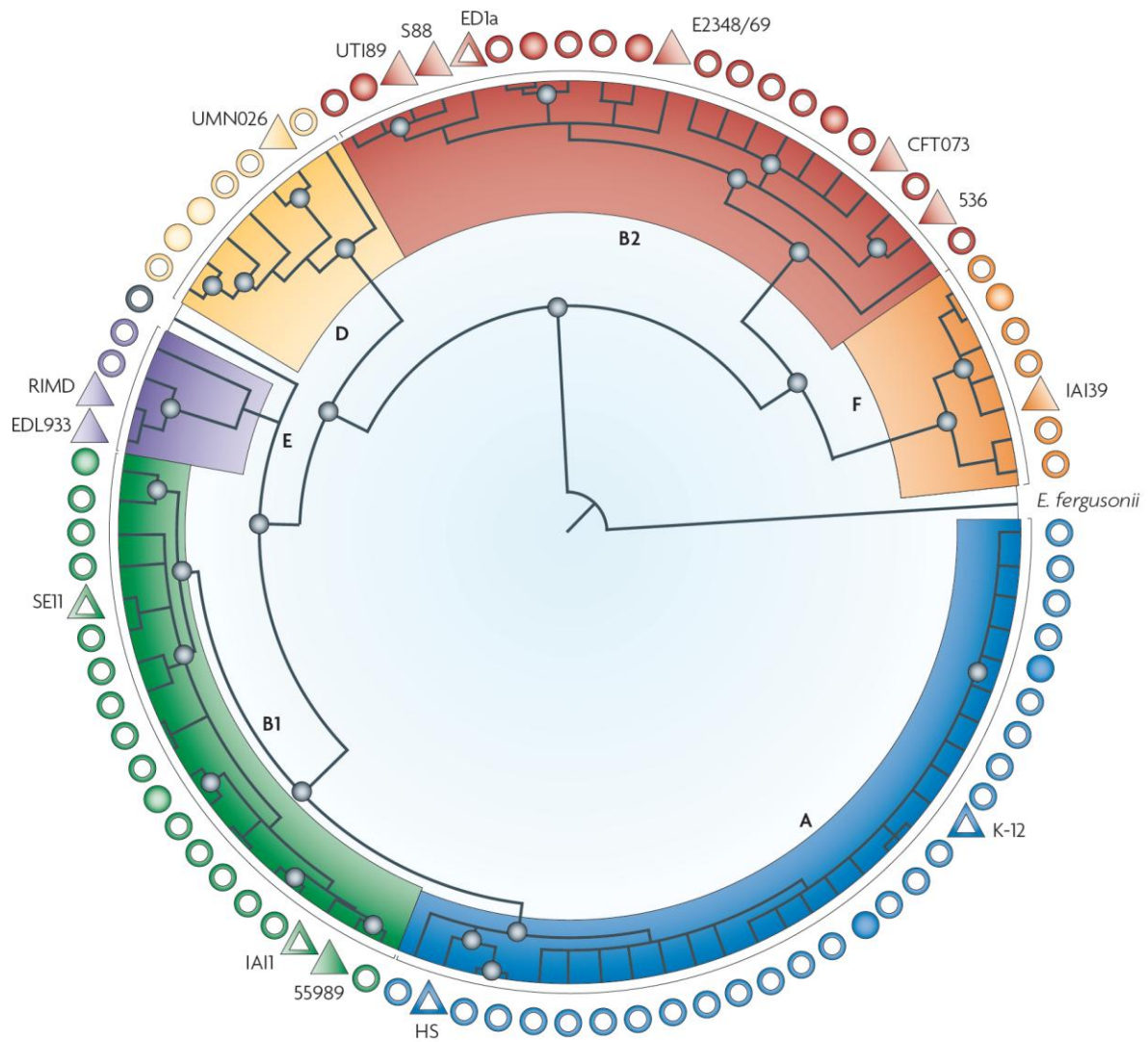


Figure 11: Classification phylogénétique de la population d'*Escherichia coli* [Tenaillon *et al.*, 2010].
Ronds : souches d'*E. coli* appartenant à la collection ECOR. Triangles : Souches références d'*E. coli*. Symboles pleins : souches *E. coli* commensales. Symboles vides : souches *E. coli* pathogènes.

il est retrouvé une circulation permanente de souches d'*E. coli* et d'*Enterococcus* résistantes aux antibiotiques [Laroche *et al.*, 2009 ; Servais et Passerat, 2009]. Les ruissellements, consécutifs à des événements pluvieux intenses seront également responsables d'apport d'*E. coli* antibio-résistantes [Ratajczak *et al.*, 2010 ; Derrien *et al.*, 2011].

4.1. *Escherichia coli* et *Enterococcus*

Escherichia coli (*E. coli*) est un bacille à Gram négatif appartenant à la classe des γ -protéobactéries et à la famille des *Enterobacteriaceae*. Il s'agit d'une bactérie anaérobie facultative fermentant le glucose et non sporulante. Le microbiote intestinal des animaux à sang chaud et des reptiles est son habitat primaire [Tenaillon *et al.*, 2010]. On distingue 4 groupes phylogénétiques majeurs : A, B1, B2 et D (Figure 11) [Selander *et al.*, 1986 ; Herzer *et al.*, 1990]. Les groupes phylogénétiques A et B1 sont constitués de souches du microbiote intestinal des hommes et animaux, mais également de pathogènes intestinaux alors que les souches du groupe B2 et dans une moindre mesure celles du groupe D sont des pathogènes extra-intestinaux (ExPEC) [Hamelin *et al.*, 2007 ; Croxen et Finlay, 2010]. En France métropolitaine, il a été montré que les souches appartenant aux groupes phylogénétiques A et B2 étaient majoritairement isolées chez l'homme alors que, à l'échelle mondiale, les souches appartenant au groupe phylogénétique B1 sont majoritairement retrouvées chez les animaux d'élevage tels que les bovins [Walk *et al.*, 2007 ; Tenaillon *et al.*, 2010]. Des souches pathogènes obligatoires, entéro-hémorragiques (EHEC), entéro-toxiques (ETEC) et entéro-invasives (EIEC) appartiennent aux groupes phylogénétiques A et B1 et sont responsables de gastro-entérites aiguës et sévères. Des *E. coli* entéro-pathogènes (EPEC), entéroaggrégatives (EAEC) et à adhésion diffuse (DAEC), responsables de diarrhées chroniques légères, sont réparties au sein des 4 groupes phylogénétiques [Hamelin *et al.*, 2007].

Les bactéries du genre *Enterococcus* sont des coques à Gram positif, catalase négatif, non sporulantes, avec un contenu en GC inférieur à 50%. Ce sont des bactéries aéro-tolérantes et halotolérantes (NaCl 6,5%). Comme pour *E. coli*, ces bactéries ont pour habitat primaire le microbiote intestinal des animaux à sang chaud. Au sein de ce genre, il existe une grande diversité d'espèces parmi lesquelles *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae*, *E. durans*, *E. casseliflavus* sont les plus représentatives [Murray, 1990]. Ces bactéries sont des pathogènes opportunistes responsables d'infections nosocomiales, notamment chez les souches d'*E. faecium* appartenant au complexe clonal CC17 [Leavis *et al.*, 2006]. Au sein de ce complexe clonal, les souches sont majoritairement résistantes à l'ampicilline et aux fluoroquinolones,

et possèdent un îlot de pathogénicité portant les gènes de virulence putatifs *esp* et *hyl*_{Efm}, codant respectivement une protéine de surface et une hyaluronidase [Top *et al.*, 2008 ; van Schaik *et al.*, 2010]. Les souches appartenant à ce complexe posséderaient également une aptitude à transférer leur résistance aux antibiotiques, notamment à la vancomycine [Leclercq *et al.*, 1989].

Une fois dans l'environnement, la survie plus élevée des bactéries du genre *Enterococcus* comparée à celle d'*E. coli* s'explique par leur meilleure aptitude à surmonter des stress environnementaux (oligotrophie, salinité, température) [Rozen et Belkin, 2001 ; van Elsas *et al.*, 2011]. Les souches d'*E. coli* peuvent persister de quelques jours (eaux marines, protozoaires) à plusieurs mois chez *E. coli* O157:H7 (fumier, sol) [van Elsas *et al.*, 2011]. Ces temps de survie dépendent des souches et des méthodologies utilisées (*in situ* et microcosmes). Certaines souches d'*E. coli* capables de se maintenir dans l'eau ont été qualifiées de « naturalisées » [Ishii *et al.*, 2006]. Cet environnement étant considéré comme leur « habitat secondaire » [Savageau *et al.*, 1983]. Chez *Enterococcus*, trois catégories de souches ont été déterminées selon leur temps de survie dans l'eau douce : de (i) 20 à 30 jours (*E. faecalis*, *E. hirae*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*), de (ii) 40 à 45 jours (*E. avium*, *E. maleodoratus*, *E. pseudoavium*, *E. mundtii*, *E. raffinosus*) et (iii) supérieur à 50 jours (*E. faecium*, *E. flavescens*, *E. durans*) [Lleó *et al.*, 2005]. En 2010, Badgley *et al.* considère que l'espèce épiphyte *E. casseliflavus* serait adaptée à son « habitat secondaire » en s'associant à la végétation sub-aquatique et en produisant un pigment jaune pour se protéger des ultraviolets [Badgley *et al.*, 2010].

E. coli et *Enterococcus* sont les bactéries retenues comme indicateurs de la qualité microbiologique des eaux douces et côtières par la norme européenne (2006/7/CE). Les valeurs seuils, en densités de bactéries dans les eaux, significatives d'un risque de gastro-entérites ont été définies sur la base des études épidémiologiques de Kay (2004) et de Wiedenmann (2004), et une méta-analyse de l'Institut de Veille Sanitaire (InVS).

4.2. La résistance bactérienne aux antibiotiques

L'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques est la conséquence de la pression de sélection exercée sur le microbiote intestinal des hommes et des animaux sous antibio-thérapie. Une fois rejetées dans les eaux, les bactéries fécales résistantes aux antibiotiques et les gènes correspondants contribueraient à enrichir le résistome (ensemble des gènes de résistance) des communautés autochtones de l'environnement, notamment en disséminant ces gènes par transfert horizontal et/ou transposition [Wright, 2007].

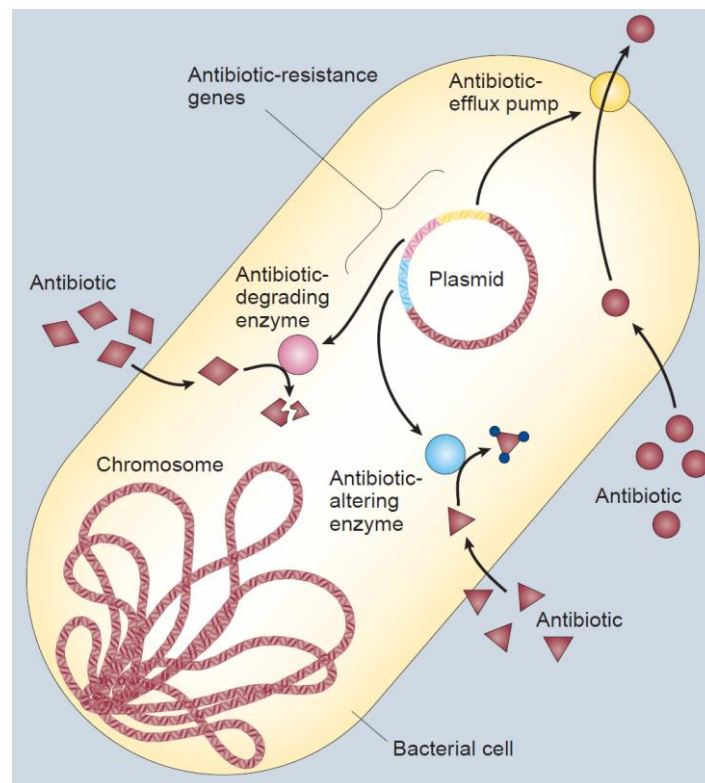


Figure 12: Principaux mécanismes cellulaires mis en jeu pour la résistance bactérienne aux antibiotiques [d'après Levy et Marshall, 2004].

4.2.1. Mécanismes et supports de la résistance

Au cours de leur évolution, les bactéries ont développé des mécanismes cellulaires pour résister aux antibiotiques (Figure 12). Il existe trois stratégies majeures de résistances bactériennes aux antibiotiques [Wright, 2005].

L'inactivation enzymatique des antibiotiques repose sur la production d'enzymes qui catalysent l'hydrolyse, le transfert de groupements chimiques (Acyl, phosphoryl, thiol, nucléotidyl, ADP-ribosyl, Glycosyl) ou d'oxydoréduction.

La diminution de l'affinité de l'antibiotique pour sa cible est le second mécanisme pour lequel sa modification peut être obtenue après (i) la mutation de la cible si elle est codée en une seule copie sur le chromosome bactérien [Martinez et Baquero, 2000], (ii) l'acquisition d'enzymes pouvant modifier la cible comme des méthylases, des ligases et les déshydrogénases [Lambert, 2005], (iii) la substitution de la cible avec la présence de plusieurs gènes codant un ou plusieurs mécanismes de résistance à un même antibiotique [Lambert, 2005] et (iv) la protection de la cible [Roberts, 2005].

Le troisième mécanisme de résistance est la diminution de la concentration intracellulaire en antibiotiques impliquant des pompes à efflux (*e.g* gène *mef* pour la résistance aux macrolides) qui rejettent l'antibiotique, ou des porines qui diminuent la perméabilité de la membrane externe des bactéries à Gram négatif.

A chaque antibiotique correspondent plusieurs mécanismes de résistance selon les genres et/ou espèces bactériennes (Tableau 11). Les éléments génétiques impliqués dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques, ne sont pas essentiels à la survie de la bactérie et sont parfois associés à des gènes de résistance aux métaux et / ou de virulence [Frost *et al.*, 2005 ; Mazel, 2006]. Trois classes d'éléments génétiques sont responsables de la dissémination de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries à Gram positif et négatif.

Les plasmides, sont des molécules d'ADN bicaténaire extra-chromosomique, généralement circulaires, capables de répliquations autonomes (réplicon) et transmissibles à la descendance [Novick et Summers, 1997]. Ces structures portent généralement des gènes de résistances aux antibiotiques préalablement apportés par des mécanismes de transposition, de recombinaison d'éléments génétiques transposables et des cassettes de résistances insérées sur un intégron [Walsh, 2006 ; Bennett, 2008 ; Martinez, 2009].

Les éléments génétiques mobiles regroupent majoritairement des éléments transposables pouvant se déplacer et disséminer des gènes entre réplicons (chromosomes, plasmides). Ces éléments génétiques codent des transposases qui catalysent leur transposition. Les gènes codant la transposase et d'autres fonctions comme la résistance aux antibiotiques,

Tableau 11 : Exemples de stratégies de résistance aux antibiotiques mises en place par les bactéries [d'après Davies et Davies, 2010 ; van Hoek *et al.*, 2011].

Famille	Molécules	Cible	Stratégie(s) de résistance	Exemples de gènes codant la résistance
β -lactamines	Pénicillines, céphalosporines, pénèmes	Biosynthèse peptidoglycane	Hydrolyse, efflux, altération cible	<i>bla, cdi, cfx, CumA, hugA, penA</i>
Aminosides	Gentamicine, streptomycine	Traduction	Phosphorylation, acétylation, efflux, altération cible	<i>aac, aad, ant, aph, apmA, npmA, rmt, spc, sph, str, sat</i>
Tétracyclines	Tétracycline, doxycycline	Traduction	Efflux, altération cible	<i>tet, otr,</i>
Macrolides	Erythromycine, azithromycine	Traduction	Hydrolyse, glycosylation, phosphorylation, efflux, altération cible	<i>erm, ere, car, cmr, lmr, lnu, mef</i>
Phénicol	Chloramphénicol	Traduction	Acétylation, efflux, altération cible	<i>cat, cml, floR, cfr, pexA</i>
Sulfamides	Sulfaméthoxazole	Inhibition de l'acide tétrahydrofolique	Efflux, altération cible	<i>sul1, sul2</i>
Glycopeptides	Vancomycine	Biosynthèse peptidoglycane	Modification de la cible	<i>van</i>

sont bordés par des séquences d'insertion (IS) elles-mêmes flanquées par des séquences IR (Répétées inversées) indispensables à la transposition. Les transposons, les ICE (Integrative and Conjugative Elements), les ISCR (Common Region) et les îlots génomiques sont les principaux éléments génétiques mobiles [Toleman *et al.*, 2006].

Les intégrons sont des systèmes de capture de cassettes de gènes de résistance dont l'expression dépend d'un promoteur unique [van Hoek *et al.*, 2011]. Les intégrons de classe 1, 2 et 3 sont principalement étudiés et sont déterminées par leurs séquences codant le gène de l'intégrase *intI* [Hall *et al.*, 1999]. Ces supports génétiques sont mobiles à l'unique condition qu'ils soient associés à d'autres éléments génétiques mobiles comme les plasmides ou les transposons [Mazel, 2006 ; Toleman *et al.*, 2006 ; Schlüter *et al.*, 2007]. A ce jour, tous les intégrons ont une organisation commune et sont composés par trois éléments clés : un gène *intI*, un site primaire de recombinaison (*attI*) et un promoteur (Pc) permettant la transcription des gènes capturés ou cassettes. Les intégrons, supports majeurs de la multi-résistance aux antibiotiques, peuvent contenir jusqu'à 8 cassettes [Naas *et al.*, 2001 ; Cambray *et al.*, 2010]. Toutefois, des intégrons sans cassette ont également été retrouvés [Soto *et al.*, 2003]. Pour les intégrons de classe 1, 2 et 3, il a été montré que les cassettes étaient majoritairement composées de gènes de résistances aux β -lactamines, aminosides (gènes *aad*) et au triméthoprim (gènes *dfr*) [Partridge *et al.*, 2009 ; van Hoek *et al.*, 2011].

Tous ces éléments génétiques sont susceptibles d'être présents sur le génome bactérien, indépendamment les uns des autres. Néanmoins, chez certaines souches cliniques, il a été montré que ces éléments génétiques pouvaient être regroupés sur un même support avec une structure en « mosaïque » permettant à un élément génétique non mobile de le devenir (intégron localisé sur un transposon) et d'être disséminé sur d'autres réplicons (Figure 13) [Martinez, 2009].

4.2.2. La dissémination des gènes de résistance

La dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques est essentiellement due à la conjugaison bactérienne et/ou la transposition. Ce dernier processus aura un rôle majeur lors des transferts horizontaux par transformation et transduction (Figure 14). La mutation peut également être responsable de l'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques.

La conjugaison plasmidique semble être le mécanisme majoritairement impliqué dans la dissémination de la résistance chez les bactéries à Gram négatif. Il s'agit du transfert unidirectionnel d'une copie d'un plasmide dit « conjugatif » d'un contact cellulaire

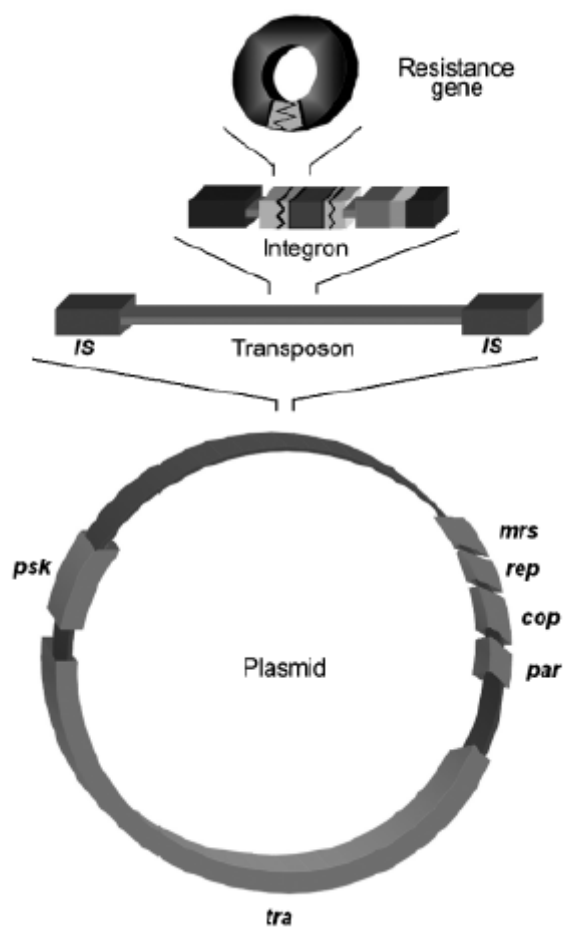


Figure 13: Schéma des différents supports génétiques et d'une structure en "mosaïque" [d'après Martinez, 2009].

étroit et spécifique (*i.e* pili) entre une bactérie réceptrice et une bactérie donatrice [Lanka et Wilkins, 1995]. Bien qu'il existe des plasmides à large spectre d'hôtes, il a plus fréquemment été observé des transferts conjugatifs entre bactéries de la même espèce, voire du même genre [Thomas et Nielsen, 2005]. De nombreuses études ont déterminé des fréquences de transfert de gènes de résistance aux antibiotiques entre bactéries en conditions optimum de laboratoire (de 10^{-1} à 10^{-3}) et en conditions oligotrophiques (de 10^{-4} à 10^{-7}) proches de celles retrouvées dans l'environnement [Bale *et al.*, 1988 ; Chandrasekaran *et al.*, 1998 ; Nikolakopoulou *et al.*, 2008]. Les transferts par conjugaison semblent dépendre (i) du ratio entre bactéries donatrices et bactéries réceptrices qui lorsqu'il est élevé augmente les probabilités de transferts, (ii) la présence d'une source de carbone et/ou d'antibiotiques qui favoriseraient les événements de conjugaison [Bale *et al.*, 1988 ; Ueki *et al.*, 2004].

Les rejets de bactéries d'origine fécale dans l'environnement s'accompagnent de la dissémination de leur matériel génétique lors de la lyse cellulaire. Dans l'environnement, les temps de persistance de l'ADN dans l'eau varient de quelques heures à plusieurs mois, selon la méthodologie utilisée (études *in situ*, microcosmes) [Nielsen *et al.* 2007]. Dans ces environnements, la concentration en ADN bactérien extracellulaire varie ($\mu\text{g.L}^{-1}$ à $10\mu\text{g.L}^{-1}$) en fonction de la dégradation enzymatique, la fragmentation et l'inactivation physique et chimique des molécules d'ADN. L'ADN d'une souche d'*E. coli* inoculée dans un sol a été détecté jusqu'à 40 jours alors qu'après 15 jours la souche n'était plus cultivable [Recorbet *et al.*, 1993]. La persistance d'ADN « nu » dans l'environnement indique qu'il peut être disponible pour des horizontaux de gènes entre bactéries allochtones et autochtones par transformation et ainsi participer à la dissémination de gènes de résistance. La transformation, mécanisme majeur chez les bactéries à Gram positif, permet l'acquisition d'une molécule d'ADN extracellulaire « nu » par une bactérie compétente [Griffith, 1928]. Lors de cet état de compétence mis en évidence chez *Neisseria gonorrhoeae* (Gram négatif) et *Bacillus subtilis* (Gram positif), les bactéries développent une perméabilité aux macromolécules d'ADN à l'aide d'un système de sécrétion de type IV [Chen et Dubnau, 2004]. Pour se maintenir, l'ADN simple brin entré dans la bactérie doit être intégré à un réplicon (plasmide, chromosome). Dans le cas contraire, ce fragment d'ADN nu sera dégradé par des nucléases. Des études en microcosmes et *in situ* ont montré que les fréquences de transfert de gènes de résistance aux antibiotiques par transformation et transposition étaient comprises entre $2.7.10^{-10}$ et 10^{-4} [Paul *et al.*, 1991 ; Maruyama *et al.*, 2006].

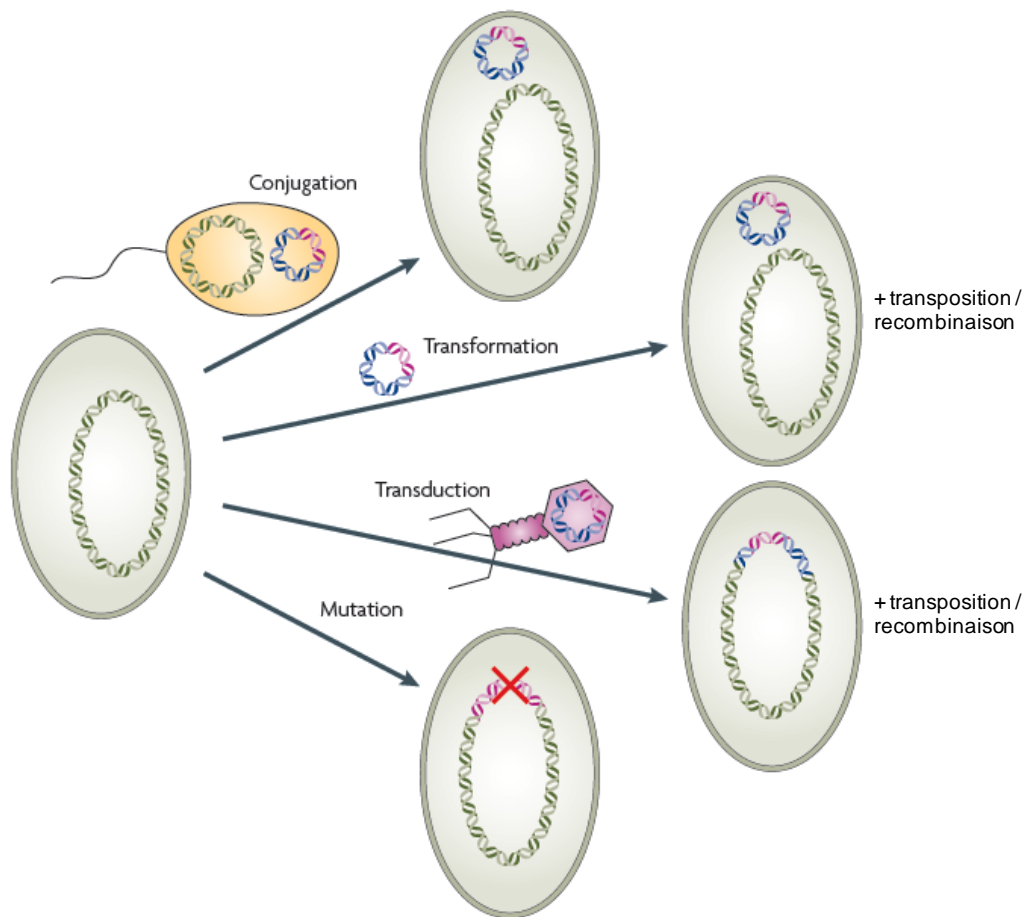


Figure 14: Mécanismes de dissémination de gènes de résistance aux antibiotiques chez les bactéries [modifié d'après Andersson et Hughes, 2010].

La transduction va permettre le transfert d'un ADN bactérien *via* un bactériophage depuis une bactérie infectée vers une bactérie réceptrice. Ce phénomène requiert une spécificité du bactériophage pour la bactérie hôte. Il est capable d'infecter une bactérie et d'y réaliser soit un cycle lytique qui aboutira soit à la lyse cellulaire, soit à la lysogénie avec l'insertion du génome du bactériophage dans le génome bactérien dans l'attente de conditions environnementales optimales pour réaliser son cycle lytique. Le transfert de gènes par ce mécanisme est consécutif à une erreur d'encapsidation dans la tête du bactériophage lors du cycle lytique : transduction généralisée. Peu d'études ont été réalisées sur ce mécanisme de transfert. Toutefois, dans l'environnement, des fréquences de transfert de gènes de résistance aux antibiotiques par transduction et transposition ont été estimées entre 10^{-9} et 10^{-7} [Jiang et Paul, 1998]. Ce phénomène rarement décrit comme impliqué dans la dissémination de gènes de résistances aux antibiotiques a toutefois était récemment mis en évidence dans l'émergence de souches pathogènes produisant une shiga toxine et responsable du syndrome hémolytique urémique [Smith *et al.*, 2012 ; Beutin *et al.*, 2012].

Les fréquences de transfert de gènes de résistance aux antibiotiques par transferts horizontaux et/ou transposition restent faibles, et nécessitent des densités cellulaires élevées pour observer une dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques. Toutefois ces densités pourraient être atteintes dans les zones d'accumulation en bactéries fécales qui s'ajoutent aux communautés autochtones, des vasières et des périphytons (hot spots). Des approches par PCR quantitative et métagénomique ont observé un enrichissement en gènes de résistances aux antibiotiques dans des sédiments de rivières fortement anthropisées [Pei *et al.*, 2006 ; Kristiansson *et al.*, 2011]. Dans ces études, aucun transfert horizontal n'a été démontré entre les bactéries allochtones provenant de la STEP et les communautés autochtones du sédiment. Kristiansson *et al.* (2011) suggère que la contamination par des résidus d'antibiotiques serait responsable de l'enrichissement en gènes de résistance aux antibiotiques et de leur transfert des communautés autochtones à des souches pathogènes pour l'homme : rétro-transfert.

OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE

Mes travaux de thèse s'inscrivent dans le cadre du projet FLASH (Devenir des antibiotiques, Flux de gènes et de bactéries Antibio-résistantes dans les Systèmes Hydriques de surface), réalisés dans le cadre des programmes scientifiques du GIP Seine-Aval (<http://www.seine-aval.fr>), du PIREN Seine (<http://www.sisyphe.upmc.fr/piren/>), et du programme EC2CO CNRS.

L'objectif de la thèse était d'étudier le devenir des antibiotiques, des souches d'*E. coli* et d'*Enterococcus* antibio-résistantes dans les eaux, et d'estimer des flux de contaminants microbiologiques à l'exutoire d'un bassin versant non jaugé à l'aide d'un modèle hydrologique conceptuel (GR).

Ce travail a été réalisé sur un site atelier : le bassin versant de la Tourville (52 Km²), sous bassin versant de la Risle (2320 Km²), dernier affluent de la Seine. Cette étude a été effectuée afin d'étudier plus finement la relation entre la prescription en antibiotiques en médecines humaine et vétérinaire, la contamination du milieu par ces molécules, et par des souches d'*E. coli* et *Enterococcus* antibio-résistantes :

- (i) **continuum « centre de soins – station d'épuration – rivière »**, système simple permettant d'étudier les apports en antibiotiques et en bactéries antibio-résistantes d'un hôpital, d'une maison de retraite, et d'une STEP, à une rivière,
- (ii) **continuum « exploitation bovine – zone urbanisée »**, un réseau hydrographique de 10 Km dont le bassin versant est caractérisé par des usages des sols contrastés de l'amont (pâturage, cultures) vers l'aval (zone urbaine).

Ce travail inter-disciplinaire a bénéficié de la mise au point par l'UMR 5805 EPOC/LPTC (Equipe d'Hélène Budzinski) d'une nouvelle méthodologie permettant la détection à de faibles concentrations de 78 molécules médicamenteuses dans les eaux environnementales. Les études de microbiologie environnementale développées à l'UMR CNRS 6143 M2C se sont enrichies de la collaboration scientifique avec l'INSERM U722 (Equipe d'Erick Denamur) pour l'étude de la structure des populations d'*E. coli* et la recherche de souches pathogènes ; et avec l'EA4655 (Equipe de Roland Leclercq) pour l'étude de la diversité des populations d'*Enterococcus*. Le site atelier a été choisi sur la base de l'expertise hydrologique et sédimentologique de l'UMR 6143 M2C sur cette zone géographique. L'accès aux sites et aux données de prescription en antibiotiques a été possible grâce à la participation active des médecins hospitaliers, des pharmacies et des services de la

ville de Pont-Audemer, du responsable d'exploitation bovine et du Groupement de Défense Sanitaire.

Chapitre 1 :

Devenir des antibiotiques et des populations d'*Escherichia coli* et d'*Enterococcus* spp. le long d'un continuum centre de soins – STEP – rivière

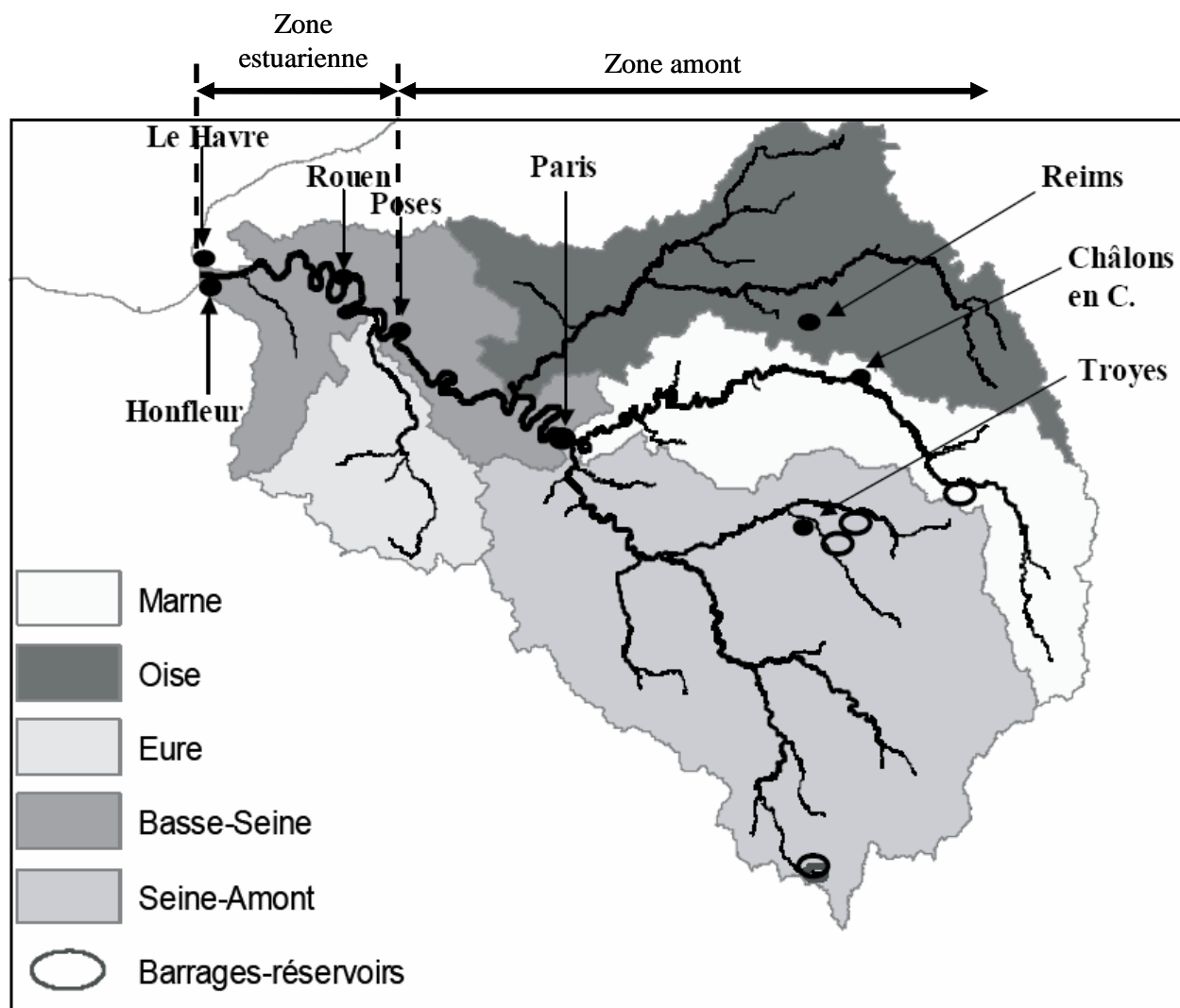


Figure 15: Cartographie du bassin versant de la Seine (PIREN-Seine). Les programmes PIREN-Seine (<http://www.sisyphe.upmc.fr/piren/>) et Seine-Aval (<http://www.seine-aval.fr>) étudient l'impact de la pression anthropique sur la contamination chimique et microbiologique des eaux en têtes de bassin jusqu'à l'embouchure de la Seine.

1. Contexte

Le bassin versant de la Seine (79 000Km²) concentre 16 millions d'habitants, 40% de l'activité économique et 30% de l'activité agricole nationale. Depuis plusieurs années, les programmes inter-disciplinaires « PIREN-Seine⁶ » et « Seine-Aval⁷ » étudient l'impact de l'activité anthropique sur la contamination chimique et microbiologique des eaux de la tête de bassin jusqu'à l'embouchure de la Seine (Figure 15). Dans les eaux de Seine, la contamination par des résidus d'antibiotiques et les bactéries fécales antibio-résistantes est permanente [Tamtam *et al.*, 2008 ; Laroche *et al.*, 2009]. La qualité des eaux à l'aval de Paris, est fortement influencée par les rejets de la STEP d'Achères (6 millions d'habitants), qui traite les eaux usées de l'agglomération parisienne, et représente jusqu'à 92% des apports en bactéries fécales à l'estuaire de Seine en période de crue. En revanche, en période de bas débit (150 m³.s⁻¹), les affluents intra-estuariens sont responsables de 76% des apports en contaminants microbiologiques [Garcia-Armisen *et al.*, 2005]. Durant cette période, une étude statistique n'a pas permis d'établir de relation entre les flores indicatrices de contamination fécale (*E. coli*, *Enterococcus*) et la présence de souches pathogènes témoignant de la complexité du système étudié, notamment la dynamique des matières en suspension et l'effet de la pluviométrie. Ainsi, le déterminisme de la contamination dépendra des zones de l'estuaire (rejets de STEPs, dynamique sédimentaire, salinité), des facteurs hydrologiques (pluviométrie, débit) et de la proximité des affluents. L'étude des sérotypes des souches de *Salmonella* isolées des eaux de l'estuaire de Seine a montré que la contamination est mixte avec une origine humaine et animale [Touron *et al.*, 2007].

Dans la zone de l'embouchure de l'estuaire de Seine, où la qualité microbiologique des eaux influence celle des moules de baie de Seine, il existe des apports provenant de la Risle. La confluence de cet affluent avec la Seine a lieu dans la zone du bouchon vaseux, zone extrêmement turbide avec un mélange eau douce – eau salée. Une approche de modélisation a identifié l'importance de la resuspension des sédiments issus des vasières dans les apports en bactéries fécales dans les eaux [de Brauwere *et al.*, 2011]. Le bassin versant de la Risle (2000 Km²), en rive gauche de la Seine, est soumis à des pressions humaines et animales, et simule à moindre échelle des comportements hydrologiques et sédimentaires identiques à ceux de la Seine. Pour mieux comprendre les résultats acquis en Seine, un réseau hydrographique peu hiérarchisé a été choisi afin d'étudier plus finement le devenir des contaminants chimiques et microbiologiques des sources (humaine, animale) jusqu'au milieu récepteur (Figure 16).

⁶ Etude des réseaux hydrographiques des têtes de bassin jusqu'à Poses (limite de l'influence tidale)

⁷ Etude de la partie aval de la Seine sous influence tidale (Poses à l'embouchure)

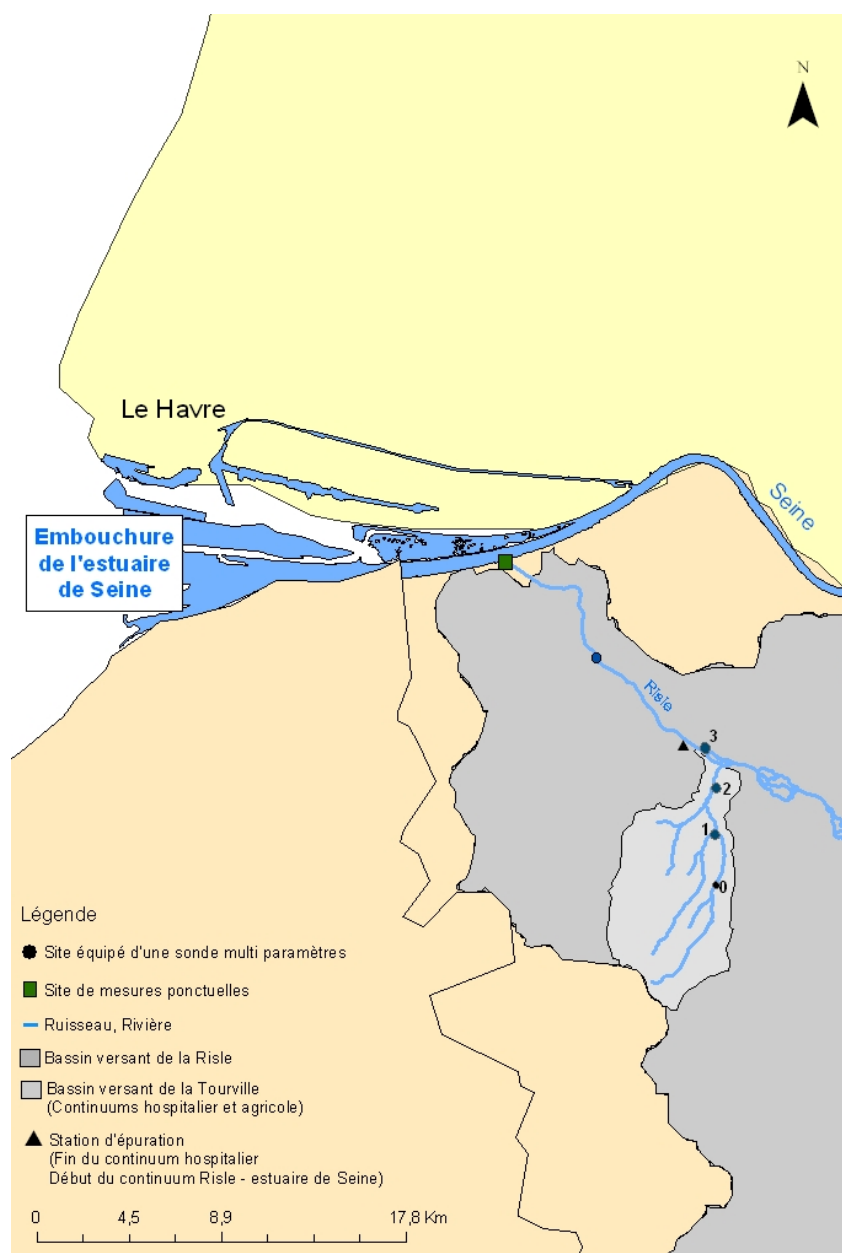


Figure 16: Cartographie du site atelier de la Risle.

2. Objectif

Cette étude visait à mieux comprendre le devenir des antibiotiques et des populations d'*E. coli* et d'*Enterococcus* dont les souches antibio-résistantes le long d'un continuum hospitalier : centre de soins - STEP (entrée et sortie) – milieu récepteur (rivière, Risle). Un des objectifs était d'étudier la relation entre les prescriptions d'antibiotiques en médecine humaine et la contamination des eaux en antibiotiques et bactéries fécales antibio-résistantes à l'échelle de ce continuum.

3. Démarche et stratégie expérimentale

Ce travail repose sur une approche interdisciplinaire qui associe des hydrologues (UMR 6143 M2C), des chimistes (UMR CNRS 5805 EPOC/LPTC), microbiologistes de l'environnement (UMR 6143 M2C) et des épidémiologistes d'*E. coli* et *Enterococcus* (INSERM U722, EA4655). Ce projet a bénéficié d'une collaboration étroite avec les équipes du centre de soins et les pharmacies de la ville qui a permis l'accès aux données sur prescriptions en antibiotiques. Le continuum hospitalier (4 Km) : centre de soins - STEP (entrée et sortie) – milieu récepteur (rivière) est localisé sur un site atelier à 10Km en amont de la confluence Risle – estuaire de Seine (Figure 17). Le centre de soins est composé d'un hôpital régional (87 lits) où le temps de séjour des patients varie de 4 à 28 jours et d'une maison de retraite (180 personnes) où les personnes résident en moyenne 10 ans. La STEP, d'une capacité de 15000 équivalent-habitants, traite les eaux usées de la zone urbaine à l'aide d'un pré-traitement (dégrillage, désablage), d'un traitement primaire (clarificateur) et d'un traitement secondaire par des boues activées suivi d'un clarificateur. Cinq sites ont été échantillonnés pendant deux campagnes (juin 2009, décembre 2009): les effluents de sortie de l'hôpital et de la maison de retraite, les effluents bruts et traités de la STEP et l'eau de la Risle dans le panache de la STEP (4 m) (Tableau 12). Les analyses chimiques et microbiologiques ont été réalisées sur des échantillons moyennés 24h (échantillonneurs automatiques ISCO®) pour les cinq sites, à l'exception des effluents de sortie de l'hôpital, de la maison de retraite et de la Risle pour la campagne de juin 2009 (Figure 17).

Dans le cadre de ces travaux, il a été développé une nouvelle méthodologie par l'UMR CNRS 5805 EPOC/LPTC (H. Budzinski) pour l'analyse des molécules d'antibiotiques, utilisant une extraction en phase solide (SPE) suivie d'une chromatographie en phase liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem (LC-MS/MS), qui a permis la détection simultanée de faibles concentrations (ng.L^{-1}) de 34 molécules d'antibiotiques.

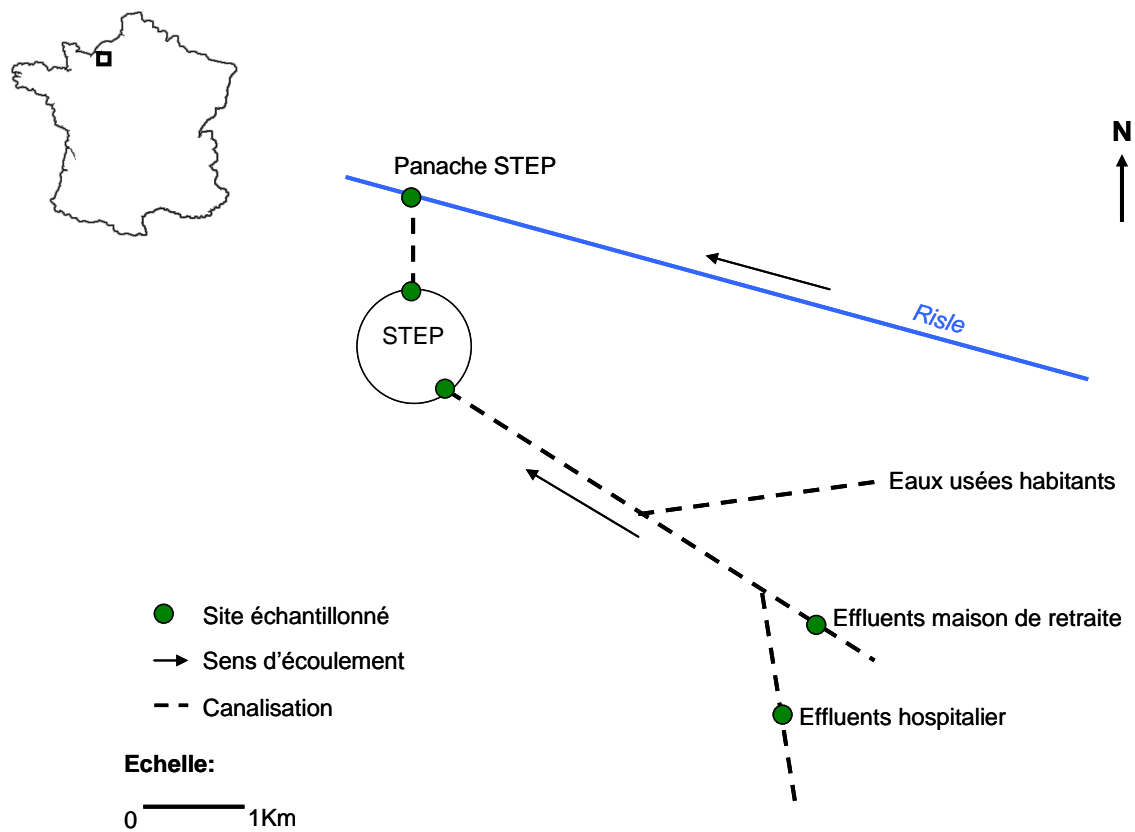


Figure 17: Stratégie d'échantillonnage le long du continuum centre de soins - STEP – rivière.

L'étude de la structure des populations d'*E. coli* et d'*Enterococcus* a bénéficié des approches complémentaires entre la microbiologie environnementale développée à l'UMR 6143 M2C et les recherches sur l'épidémiologie d'*E. coli* et d'*Enterococcus* menées à l'INSERM U722 (E. Denamur) et l'EA4655 (R. Leclercq). Dans le cadre de ces travaux de thèse, une collection de souches d'*E. coli* (1520 dont 343 pour le continuum hospitalier) et d'*Enterococcus* (401 dont 198 pour le continuum hospitalier) a été établie et partagée entre les différentes équipes. La structure des populations a été réalisée sur la base de la distribution des groupes phylogénétiques A, B1, B2 et D chez *E. coli*, et de la diversité en espèces chez *Enterococcus*. Pour chacune des souches, le phénotype d'antibio-résistance a été caractérisé par la méthode de diffusion sur gélose selon les recommandations de la Société Française de Microbiologie, complété par la recherche d'intégrons chez *E. coli* ou de gènes de résistance aux macrolides (*ermB*, *mefA*) et tétracyclines (*tetM*) chez *Enterococcus* (voir section « Matériel et Méthodes »).

4. Résultats et discussion

Cette étude a été menée pour deux périodes épidémiologiques : une période hivernale (Décembre 2009) caractérisée par une forte consommation en substances médicamenteuses, en lien direct avec des épidémies de grippe et de gastro-entérites, et une période estivale (juin 2009) avec une plus faible consommation de médicaments (Tableau 13). Pour les deux périodes, 8 grandes familles d'antibiotiques ont été prescrites en médecine hospitalière et de ville pour la zone étudiée, l'amoxicilline étant majoritairement consommée. A la maison de retraite et à l'hôpital, la prescription en antibiotiques n'est pas dépendante de la période, alors qu'en médecine de ville la consommation en antibiotiques est 1 à 2 fois plus élevée d'octobre 2009 à mars 2010 par rapport à la période d'avril 2009 à septembre 2009.

Les effluents du centre de soins, prélevés avant leurs raccordements au réseau unitaire, sont contaminés par des quinolones/fluoroquinolones, des sulfamides et des macrolides auxquelles s'ajoutent en période hivernale des pénicillines, des céphalosporines et des tétracyclines (Tableaux 14 et 15). Bien qu'elles soient fortement consommées, les faibles concentrations en pénicillines (*i.e* amoxicilline) ou leur absence dans les eaux usées s'expliquent par l'hydrolyse rapide de cette famille de molécules dans les environnements aquatiques [Längin *et al.*, 2009]. Les concentrations les plus élevées sont observées dans les effluents hospitaliers et atteignent des valeurs de 160 µg.L⁻¹ (céphalosporines) et 141 µg.L⁻¹ (quinolones).

Tableau 12: Contamination en *E. coli* et *Enterococcus* le long du continuum centre de soins - STEP – rivière.

	Hôpital ¹		Maison Retraite ²		Effluent brut STEP		Effluent traité STEP		Rivière	
	Juin 09	Déc. 09	Juin 09	Déc. 09	Juin 09	Déc. 09	Juin 09	Déc. 09	Juin 09	Déc. 09
Site	1		2		3		4		5	
Densité population	41	87	180		9058 habitants / 221 patients		9058 habitants / 267 patients		Rejet STEP	
Fréquence de l'usage d'antibiotiques	++	++	+	+	+/-	+/-	n.p		n.p	
Echantillonnage	Ponct.	Moy. 24h	Ponct.	Moy. 21h	Moy. 24h		Moy. 24h		Ponct.	Moy. 16h
Débit	1 m ³ .h ⁻¹		1 m ³ .h ⁻¹		2500 m ³ .j ⁻¹	4400 m ³ .j ⁻¹	2500 m ³ .j ⁻¹	4400 m ³ .j ⁻¹	6.9 m ³ .s ⁻¹	10.7 m ³ .s ⁻¹
<i>Escherichia coli</i> (UFC.100mL⁻¹)	3,1±2,5.10 ⁴	8,3±3,5.10 ⁴	<5	1,9±0,3.10 ⁶	7,1±3,7.10 ⁷	3,5±2,1.10 ⁶	4,6±1,3.10 ⁴	6,7±0,4.10 ⁴	3,0±0,3.10 ³	2,6±0,6.10 ³
<i>Enterococcus</i>³ (UFC.100mL⁻¹)	-	6,5±0,1.10 ⁶	-	2,6±1,6.10 ⁵	-	7,0±0,4.10 ⁵	-	1,4±0,2.10 ⁴	-	3,7±1,0.10 ²

¹ : temps de séjour de 4 à 28 jours ; ² : temps de séjour d'au moins 10 ans ; **n.p** : non pertinent ; ++ : Forte utilisation d'antibiotiques durant le séjour des patients ; + : Utilisation faible mais répétée au cours du séjour des patients ; +/- : Habitants pouvant être sous traitement aux antibiotiques pendant la période d'échantillonnage ; **ponct** : échantillon d'1 litre prélevé ponctuellement ; ³ : uniquement analysé lors de la campagne de décembre 2009

Tableau 13: Prescriptions en antibiotiques à l'hôpital, la maison de retraite et par la médecine de ville lors de deux périodes.

Antibiotiques	Avril 2009 – Sept. 2009 (g)			Oct. 2009 – Mars 2010 (g)		
	Hôpital	Maison Retraite	Médecine de ville*	Hôpital	Maison Retraite	Médecine de ville*
Pénicillines						
Amoxicilline	7866	473	178334	7371	544	258430
Pénicilline V	0	0	0	24	0	0
Cloxacilline	84	32	506	88	16	736
Oxacilline	36	0	449	32	0	650
Pénicilline G	6	0	0	0	0	0
Piperacilline	44	0	0	164	0	0
Ticarcilline	16	0	0	0	0	0
Céphalosporines						
Céfaclor	0	0	220	0	0	398
Céfamandole	41	0	0	40	0	0
Céfazoline	240	0	0	239	0	0
Céfotaxime	685	4	0	836	0	0
Céfoxitine	125	0	0	97	0	0
Céfpodoxime	23	0	1390	12	5	2505
Céftazidime	0	0	0	6	0	0
Céftriaxome	563	110	0	686	224	0
Céfixime	181	10	299	183	62	541
Carbapénèmes						
Imipénème	25	0	0	24	0	0
Quinolones & fluoroquinolones						
Ciprofloxacine	155	17	633	115	0	980
Norfloxacine	187	40	425	124	100	656
Ofloxacine	219	6	57	168	14	88
Acide pipémédique	12	0	36	16	0	56
Levofloxacine	318	0	126	424	0	195
Moxifloxacine	0	0	164	0	0	254
Pefloxacine	0	0	1	0	0	2
Lomefloxacine	0	0	15	0	0	24
Sulfamides						
Sulfaméthoxazole	27	0	504	9	0	902
Tétracyclines						
Doxycycline	0	0	684	4	0	1562
Aminosides						
Amikacine	49	0	-	46	0	-
Gentamicine	33	0	-	47	0	-
Macrolides						
Azithromycine	5	0	-	8	0	-
Clindamycine	31	0	-	43	0	-
Erythromycine	39	0	-	55	20	-
Telithromycine	20	0	-	21	0	-
Pristinamycine	855	100	-	44	0	-
Roxithromycine	134	0	-	103	34	-

* : Quantité moyenne obtenue auprès des pharmacies de la zone étudiée.

Tableau 14 : Contamination en antibiotiques et *E. coli* antibio-résistantes dans les effluents du centre hospitalier pendant une période de faible consommation en antibiotiques (Juin 2009).

Antibiotiques	Effluents de l'hôpital		Effluents de la maison de retraite	
	Concentration en antibiotiques ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	% <i>E. coli</i> Antibio-résistantes (n/N)	Concentration en antibiotiques ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	% <i>E. coli</i> Antibio-résistantes (n/N)*
Pénicillines				
Amoxicilline	nd	4,4% (2/45)	nd	
Ticarcilline	-	4,4% (2/45)	-	
Autres pénicillines	nd	-	nd	
Céphalosporines				
Céfalotine	-	2,2% (1/45)	-	
Autres céphalosporines	nd	-	nd	
Carbapénèmes				
Imipénème	-	0,0% (0/45)	-	
Quinolones & fluoroquinolones				
Ciprofloxacine	0,05	1,1% (1/45)	nd	
Acide nalidixique	-	1,1% (1/45)	-	
Ofloxacine	0,78	-	0,6	
Norfloxacine	nd	-	0,5	
Acide pipémédique	nd	-	0,04	
Autres quinolones	nd	-	nd	
Tétracyclines				
Tétracycline	nd	28,9% (13/45)	nd	
Autres tétracyclines	nd	-	nd	
Phénicols				
Chloramphénicol	nd	4,4% (2/45)	nd	
Autres phénicols	nd	-	nd	
Sulfamides				
Sulfaméthoxazole	nd	22,2% (10/45)	nd	
Sulfadiazine	0,007		0,01	
Autres sulfamides	nd	-	nd	
Aminosides				
Kanamycine	-	2,2% (1/45)	-	
Autres aminosides	-	0,0% (0/45)	-	
Macrolides				
Azithromycine	0,4	-	0,02	
Roxithromycine	44,7	-	0,09	
Spiramycine	1,2	-	0,03	
Autres macrolides	nd	-	nd	

* *E. coli* < 5 UFC.100mL⁻¹, Aucune souche n'a pu être isolée ; - : Antibiotique ou antibio-résistance non testé(e) ; **nd** : antibiotique non détecté dans l'échantillon ; **n** : Nombre d'isolat(s) résistant(s) ; **N** : Nombre total d'isolats testés.

Tableau 15 : Contamination en antibiotiques et *E. coli* antibio-résistantes dans les effluents du centre hospitalier pendant une période de forte consommation en antibiotiques (Décembre 2009).

Antibiotiques	Effluents de l'hôpital		Effluents de la maison de retraite	
	Concentration en antibiotiques ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	% <i>E. coli</i> Antibio-résistantes (n/N)	Concentration en antibiotiques ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	% <i>E. coli</i> Antibio-résistantes (n/N)
Pénicillines				
Amoxicilline	0,8	10,0% (5/50)	nd	38,0% (19/50)
Ticarcilline	-	10,0% (5/50)	-	38,0% (19/50)
Ampicilline	nd	-	0,7	-
Autres pénicillines	nd	-	nd	-
Céphalosporines				
Céfalotine	-	2,0% (1/50)	-	6,0% (3/50)
Céfotaxime	160	0,0% (0/50)	nd	0,0% (0/50)
Autres céphalosporines	nd	-	nd	-
Carbapénèmes				
Imipénème	-	0,0% (0/50)	-	0,0% (0/50)
Quinolones & fluoroquinolones				
Ciprofloxacine	73	8,0% (4/50)	nd	6,0% (3/50)
Acide nalidixique	-	6,0% (3/50)	-	42,0% (21/50)
Ofloxacine	68	-	0,08	-
Norfloxacine	0,1	-	0,04	-
Acide pipémédique	nd	-	59	-
Autres quinolones	nd	-	nd	-
Tétracyclines				
Tétracycline	nd	16,0% (8/50)	nd	38,0% (19/50)
Autres tétracyclines	nd	-	nd	-
Phénicols				
Chloramphénicol	nd	6,0% (3/50)	nd	6,0% (3/50)
Autres phénicols	nd	-	nd	-
Sulfamides				
Sulfaméthoxazole	0,01	2,0% (1/50)	0,005	24,0% (12/50)
Sulfapyridine	0,006	-	-	-
Autres sulfamides	nd	-	nd	-
Aminosides				
Kanamycine	-	8,0% (4/50)	-	4,0% (2/50)
Gentamycine	-	0,0% (0/50)	-	4,0% (2/50)
Streptomycine	-	0,0% (0/50)	-	26,0% (13/50)
Autres aminosides	nd	-	nd	-
Macrolides				
Azithromycine	0,1	-	0,03	-
Roxithromycine	2,8	-	0,03	-
Spiramycine	3,9	-	21	-
Autres macrolides	1,1	-	0,004	-

* *E. coli* < 5 UFC.100mL⁻¹, Aucune souche n'a pu être isolée ; - : Antibiotique ou antibio-résistance non testé(e) ; **nd** : antibiotique non détecté dans l'échantillon ; **n** : Nombre d'isolat(s) résistant(s) ; **N** : Nombre total d'isolats testés.

Tableau 16: Contamination en antibiotiques et *E. coli* antibio-résistantes dans les effluents brut et traité de la STEP lors de deux périodes d'échantillonnage (Juin 2009, Déc. 2009).

Antibiotiques	Effluent brut de la station d'épuration				Effluent traité de la station d'épuration			
	Concentration en antibiotiques (µg.L ⁻¹)		<i>E. coli</i> Antibio-résistantes (n/N)		Concentration en antibiotiques (µg.L ⁻¹)		<i>E. coli</i> Antibio-résistantes (n/N)	
	Juin	Déc.	Juin	Déc.	Juin	Déc.	Juin	Déc.
Pénicillines								
Amoxicilline	nd	0,09	13/48	11/49	nd	nd	14/50	5/49
Ticarcilline	-	-	13/48	10/49	-	-	10/50	5/49
Ampicilline	nd	-	-	-	nd	nd	-	-
Cloxacilline	nd	0,02	-	-	nd	nd	-	-
Autres pénicillines	nd	-	-	-	nd	nd	-	-
Céphalosporines								
Céfaloine	-	-	1/48	3/49	-	-	2/50	1/49
Céfotaxime	nd	0,4	0/48	0/49	nd	0,04	0/50	0/49
Autres céphalosporines	nd	-	0/48	1/49	nd	nd	0/50	1/49
Carbapénème								
Imipénème	-	-	0/48	0/49	-	-	0/50	0/49
Quinolones & fluoroquinolones								
Ciprofloxacine	nd	nd	5/48	2/49	0,03	0,04	2/50	2/49
Acide nalidixique	-	-	5/48	3/49	-	-	2/50	2/49
Ofloxacine	0,2	0,4	-	-	0,2	0,1	-	-
Norfloxacine	0,09	nd	-	-	0,06	0,04	-	-
Acide pipémédique	0,05	0,02	-	-	0,03	0	-	-
Autres quinolones	nd	nd	-	-	nd	nd	-	-
Tétracyclines								
Tétracycline	0,1	0,08	15/48	17/46	0,01	0,01	15/50	15/49
Autres tétracyclines	nd	0,07	-	-	nd	nd	-	-
Phénicol								
Chloramphénicol	nd	nd	11/48	3/49	nd	nd	7/50	3/49
Autres phénicol	nd	nd	-	-	nd	nd	-	-
Sulfamides								
Sulfaméthoxazole	0,4	0,6	10/48	8/49	0,16	0,5	5/50	4/49
Sulfapyridine	0	0,05	-	-	0,009	0,06	-	-
Autres sulfamides	0,009	0,002	-	-	0,02	0,008	-	-
Aminosides								
Kanamycine	-	-	2/48	4/49	-	-	6/50	1/49
Gentamycine	-	-	2/48	1/49	-	-	0/50	0/49
Streptomycine	-	-	1/48	9/49	-	-	0/50	5/49
Autres aminosides	nd	nd	-	-	nd	nd	-	-
Macrolides								
Azithromycine	0,9	0,3	-	-	0,8	0,3	-	-
Roxithromycine	1,9	1,3	-	-	0,5	1,1	-	-
Spiramycine	1,0	0,2	-	-	0,2	0,07	-	-
Autres macrolides	0,8	1,6	-	-	0,3	0,3	-	-

* *E. coli* < 5 UFC.100mL⁻¹, Aucune souche n'a pu être isolée ; - : Antibiotique ou antibio-résistance non testé(e) ; **nd** : antibiotique non détecté dans l'échantillon ; **n** : Nombre d'isolat(s) résistant(s) ; **N** : Nombre total d'isolats testés.

A l'entrée de la STEP, qui collecte les eaux usées du centre de soins et des 9058 habitants de la zone urbaine, les concentrations en antibiotiques ont diminué d'un facteur 1000 pour les quinolones/fluoroquinolones (dizaine de $\mu\text{g.L}^{-1}$ à la dizaine de ng.L^{-1}) en période de forte consommation en antibiotiques (Tableau 16). Ces résultats s'expliquent par la dilution des effluents et la stabilité des molécules. Les concentrations en antibiotiques sont plus élevées à l'entrée de la STEP en période hivernale témoignant des prescriptions plus importantes. Comme il a été déjà décrit dans la littérature, les concentrations en tétracyclines et en macrolides diminuent respectivement en moyenne de 90% et 57% lors des traitements de la STEP [Giger *et al.*, 2003 ; Li *et al.*, 2008a]. Etonnamment, l'efficacité d'élimination des quinolones/fluoroquinolones (décembre 2009 : 52,6%, juin 2009 : 9,3%), et des sulfamides (décembre 2009 : 22,5%, juin 2009 : 9,3%), varie selon la période d'échantillonnage. Ces résultats s'expliqueraient par une meilleure adsorption de ces molécules sur les boues activées lors du traitement en période hivernale [Li *et al.*, 2008a ; Ge *et al.*, 2010]. Dans la rivière, seules les molécules les plus persistantes, les quinolones/fluoroquinolones, les sulfamides et les macrolides, sont détectées à des concentrations variant de $1,5 \text{ ng.L}^{-1}$ à 87 ng.L^{-1} (Tableau 17). Les concentrations plus élevées en période de faible consommation en antibiotiques (juin 2009) s'expliquent par l'échantillonnage ponctuel des eaux.

Parallèlement à cette contamination chimique, les eaux sont contaminées par des bactéries fécales (Tableau 12). Le long du continuum, pour les deux campagnes les densités en *E. coli* augmentent de $3,1 \cdot 10^4 \text{ UFC.100mL}^{-1}$ à $7,1 \cdot 10^7 \text{ UFC.100mL}^{-1}$ de l'effluent hospitalier à l'entrée de la STEP puis diminuent d'un facteur 1000 à la sortie de la STEP pour atteindre une densité d'en moyenne $2,8 \cdot 10^3 \text{ UFC.100mL}^{-1}$ dans la rivière. En juin 2009, l'absence de contamination en *E. coli* dans l'effluent de la maison de retraite s'explique par la présence de détergents dans un échantillon d'eau ponctuel. La contamination en *Enterococcus*, qui n'a été réalisée que pour la période hivernale, évolue différemment avec une diminution constante le long du continuum caractérisée par un abattement de 90% dans la STEP, et une dilution dans les eaux de la rivière où la densité atteint $3,7 \cdot 10^2 \text{ UFC.100mL}^{-1}$.

L'analyse de la structure des populations d'*E. coli*, sur la base de la distribution des groupes phylogénétiques A, B1, B2 et D montre que le groupe phylogénétique B1, faiblement représenté dans les effluents du centre de soins, augmente progressivement le long du continuum alors que le groupe A (supérieur à 50%) reste majoritaire (Tableau 18). Ces résultats témoignent de l'importance de la contamination d'origine humaine [Tenaillon *et al.*, 2010]. Au sein de la population d'entérocoques, alors que l'espèce *E. faecalis* est prédominante dans les fèces humain, *E. faecium* est l'espèce majoritaire isolée le long du

Tableau 17: Contamination en antibiotiques et *E. coli* antibio-résistantes du rejet de l'effluent traité de la STEP dans la rivière lors de deux périodes d'échantillonnage (Juin 2009, Déc. 2009).

Antibiotiques	Rivière			
	Concentration en antibiotiques ($\mu\text{g},\text{L}^{-1}$)		Antibio-résistance d' <i>E. coli</i> (n/N)	
	Juin	Déc.	Juin	Déc.
Pénicillines				
Amoxicilline	nd	0	6/50	8/50
Ticarcilline	-	-	6/50	7/50
Ampicilline	nd	0	-	-
Cloxacilline	nd	0	-	-
Autres pénicillines	nd	nd	-	-
Céphalosporines				
Céfalcone	nd	nd	0/50	1/50
Céfotaxime	nd	0	0/50	0/50
Autres céphalosporines	nd	nd	0/50	1/50
Carbapénèmes				
Imipénème	-	-	0/50	0/50
Quinolones & fluoroquinolones				
Ciprofloxacine	nd	nd	2/50	0/50
Acide nalidixique	-	-	3/50	2/50
Ofloxacine	0,01	0,001	-	-
Norfloxacine	0,01	nd	-	-
Acide pipémédique	nd	nd	-	-
Autres quinolones	0,002	nd	-	-
Tétracyclines				
Tétracycline	nd	nd	13/50	9/50
Autres tétracyclines	nd	nd	-	-
Phénicols				
Chloramphénicol	nd	nd	3/50	2/50
Autres phénicols	nd	nd	-	-
Sulfamides				
Sulfaméthoxazole	0,02	0,004	3/50	3/50
Sulfapyridine	0,001	0,001	-	-
Autres sulfamides	0,01	nd	-	-
Aminosides				
Kanamycine	-	-	2/50	1/50
Gentamycine	-	-	1/50	0/50
Streptomycine	-	-	0/50	2/50
Autres aminosides	nd	nd	-	-
Macrolides				
Azithromycine	0,02	nd	-	-
Roxithromycine	0,02	0,002	-	-
Spiramycine	0,01	nd	-	-
Autres macrolides	0,04	0,005	-	-

* *E. coli* < 5 UFC.100mL⁻¹, Aucune souche n'a pu être isolée ; - : Antibiotique ou antibio-résistance non testé(e) ; **nd** : antibiotique non détecté dans l'échantillon ; **n** : Nombre d'isolat(s) résistant(s) ; **N** : Nombre total d'isolats testés.

continuum à raison de 89% à 98% des isolats. Des résultats similaires ont été observés par Lanthier *et al.* (2010), suggérant que l'occurrence élevée de cette espèce pourrait être la conséquence du temps de séjour de ces souches dans les eaux.

Dans les rejets du centre de soins, en période hivernale, on retrouve une importante proportion de souches d'origine hospitalière qui décroît rapidement le long du continuum. Ainsi, l'occurrence des souches d'*E. coli* portant un intégron de classe 1 diminue significativement ($p\text{-value} < 0,001$, $\alpha = 5\%$) de l'effluent de la maison de retraite (36,0%) jusqu'à la rivière (8,0%) (Tableau 19). Ces résultats sont en accord avec ceux observés dans les eaux d'un continuum similaire en Pologne [Koczura *et al.*, 2011]. De même, chez les entérocoques, l'occurrence de souches *E. faecium* appartenant au complexe clonal CC17 et impliquées dans des infections nosocomiales, diminue des rejets hospitaliers (100.0%) jusqu'à la rivière (15.3%) (Figure 18).

Le long du continuum, des souches d'*E. coli* et d'Entérocoques résistantes aux antibiotiques ont également été isolées des eaux (Tableaux 14, 15, 16 et 17). Dans les effluents de l'hôpital, les souches d'*E. coli* sont majoritairement résistantes aux tétracyclines (22,5%) pour les deux périodes, et aux sulfamides (22,2%) et aux pénicillines selon les périodes. La variabilité de ces résultats s'explique par des séjours courts des patients, dont certains sont soumis à une antibiothérapie avant leur hospitalisation. Dans l'effluent de la maison de retraite, les isolats d'*E. coli* sont majoritairement résistants aux pénicillines (38,0%), aux quinolones/fluoroquinolones (42,0%), aux tétracyclines (38,0%), aux sulfamides (24,0%) et aux aminosides (28,0%). Lors du traitement de la STEP, en parallèle à l'abattement de bactéries fécales, on observe une diminution plus importante de la proportion de souches d'*E. coli* résistantes aux antibiotiques au sein de la population totale, qui s'expliquerait par une perte de cultivabilité préférentielle de ces souches. Dans la rivière, la proportion d'*E. coli* multi-résistantes est significativement plus faible que dans les effluents de la maison de retraite, avec des phénotypes de résistances majoritaires aux tétracyclines et aux pénicillines pour les deux périodes échantillonnées (Tableaux 17, 19, 20). En décembre 2009, une étude similaire a été menée sur les populations d'entérocoques (Tableau 21). Dans les effluents de l'hôpital et de la maison de retraite, les isolats d'*Enterococcus* sont majoritairement résistants à l'ampicilline, respectivement 100% et 87,5%, à la ciprofloxacine, 75% et 100%, et à l'erythromycine, 72% et 87%. Le traitement de la STEP ne diminue pas la proportion de souches résistantes aux tétracyclines et aux macrolides (erythromycine). Toutefois, les niveaux de résistance (phénotype intermédiaire) sont plus faibles, et les supports génétiques impliqués sont différents de l'amont du continuum à l'environnement

Tableau 18: Structure des populations d'*E. coli* isolées le long du continuum centre de soins – STEP – rivière.

Site	Structure de la population d' <i>E. coli</i> (N)							
	A (n/N)		B1 (n/N)		B2 (n/N)		D (n/N)	
	Faible	Forte	Faible	Forte	Faible	Forte	Faible	Forte
Effluent hospitalier	71,1% (32/45)	*	2,2% (1/45)	*	26,7% (12/45)	*	0/45	*
Effluent maison de retraite	-	60,0% (30/50)	-	6,0% (3/50)	-	30,0% (15/50)	-	4,0% (1/50)
Effluent brut STEP	58,3% (28/48)	61,2% (30/49)	22,9% (11/48)	18,3% (9/49)	14,6% (7/48)	6,2% (3/49)	2/48 (4,2)	14,3% (7/49)
Effluent traité STEP	60,0% (30/50)	65,4% (32/49)	28,0% (14/50)	16,3% (8/49)	8,0% (4/50)	2,0% (1/49)	2/50 (4,0)	16,3% (8/49)
Rivière	50,0% (25/50)	56,0% (28/50)	24,0% (12/50)	32,0% (16/50)	18,0% (9/50)	4,0% (2/50)	4/50 (8,0)	8,0% (4/50)

N : Nombre total d'isolats testés ; n : nombre d'isolat(s) appartenant au groupe phylogénétique ; * : campagne invalidée car résultats incohérents avec un rapport anormal A/B1 (2/45) qui s'explique probablement par des rejets anciens (accumulation de matières fécales qui sont rejetées après plusieurs jours) ; - : aucun isolat

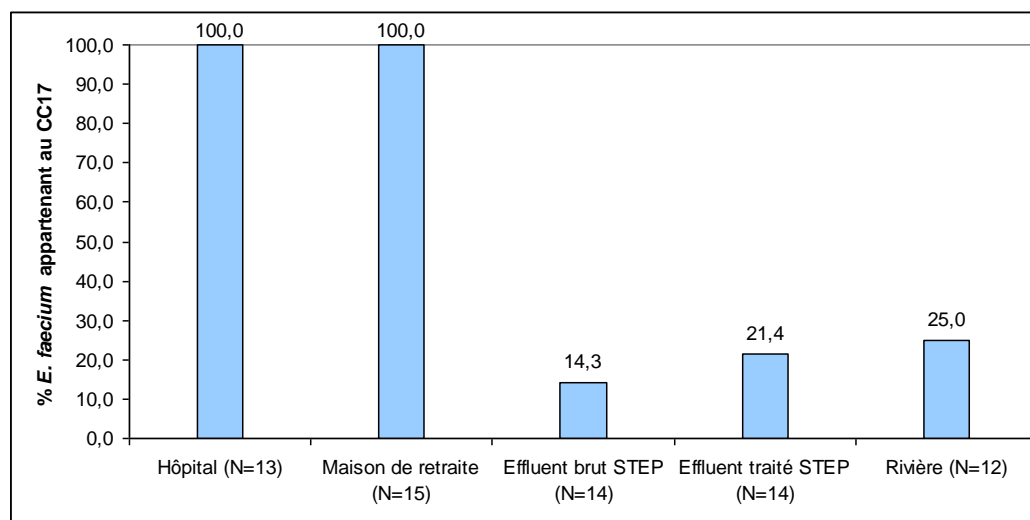


Figure 18: Evolution du complexe clonal CC17 au sein de l'espèce *E. faecium* le long du continuum hospitalier. N: nombre d'isolats testés.

récepteur (Tableau 22), témoignant d'une modification de la structure des populations d'*Enterococcus*. Ainsi, la résistance à l'érythromycine est majoritairement due aux gènes *ermB* et *mefA* chez les souches du centre de soins, alors que des mécanismes différents sont présents chez les entérocoques isolés à l'aval du continuum. Aucune souche résistante à la vancomycine n'a été isolée des effluents du centre de soins jusqu'à la rivière.

La comparaison des phénotypes d'antibio-résistance des isolats, avec la consommation en antibiotiques des patients de la maison de retraite, montre que pour tous les antibiotiques prescrits des résistances correspondantes ont été identifiées chez *E. coli* et *Enterococcus* (*i.e* β -lactamines). Ces résultats s'expliquent par la prescription d'antibiotiques chez les patients pendant plusieurs années (10 ans), qui engendre une sélection d'*E. coli* antibio-résistantes dans le tractus digestif des patients. Cependant, chez *E. coli* les résistances à la tétracycline et au sulfaméthoxazole sont observées alors qu'aucune de ces molécules n'a été prescrite (Tableau 23). La présence d'intégrons qui confèrent des résistances simultanées à plusieurs antibiotiques est à l'origine de ce phénotype. Ainsi, dans les effluents de la maison de retraite, 86,7% des souches résistantes à la tétracycline et au sulfaméthoxazole possèdent le gène codant l'intégrase de classe 1 (Tableau 23). Ces phénotypes s'expliquent par la présence de cassettes de résistance aux aminoglycosides (gènes *aad*) et au triméthoprim (gènes *dfr*) dans la région variable de l'intégron de classe 1 et le gène de résistance aux sulfamides (*sulI*) à son extrémité 3' [Roe *et al.*, 2003 ; Laroche *et al.*, 2009 ; Sàenz *et al.*, 2010 ; Xu *et al.*, 2011]. La résistance à la tétracycline serait liée à la présence d'autres supports génétiques impliqués dans la multi-résistance notamment les transposons [Roberts, 2005].

Dans cette étude nous montrons que les concentrations des différents résidus d'antibiotiques sont inférieures à celles exerçant une pression de sélection sur les bactéries (mg.L^{-1}), et qu'il n'existe pas de relation entre cette contamination et les profils de résistances des isolats d'*E. coli* et d'*Enterococcus* dans les eaux. Ces résultats s'expliquent par (i) la persistance des molécules qui dépend de leurs propriétés physico-chimiques, et (ii) la présence de supports génétiques qui confèrent des résistances ne correspondant pas aux antibiotiques prescrits (*i.e* intégrons).

Tableau 19 : Pourcentage de souches d'*E. coli* antibio-résistantes et occurrences des intégrons de classe 1 et 2 en période de faible consommation en antibiotiques (Décembre 2009)

	% de souches d' <i>E. coli</i> résistantes aux antibiotiques								% <i>E. coli</i>	% <i>E. coli</i> avec le gène	
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	MAR	<i>intI1</i>	<i>intI2</i>
Effluents hôpital	4,0	2,0	0,0	2,0	0,0	2,0	4,0	2,0	10,0	6,0	0,0
Effluent maison de retraite	34,0	10,0	6,0	6,0	8,0	16,0	0,0	2,0	38,0***	36,0***	0,0
Effluent STEP brut	18,4	4,1	2,0	6,1	0,0	10,2	2,0	2,0	22,3	16,4	0,0
Effluent STEP traité	10,2	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	4,1	14,1	8,2	2,0
Rivière (Panache STEP)	10,0	2,0	4,0	2,0	2,0	4,0	2,0	0,0	14,0***	8,0***	0,0

R1, R2,..., R10 : Résistance à un, deux,..., dix antibiotiques.

MAR : Multi-résistante aux antibiotiques (résistance à au moins 3 antibiotiques)

*** : p-value < 0,001 ; $\alpha = 5\%$

Tableau 20: Pourcentage de souches d'*E. coli* antibio-résistantes et occurrences des intégrons de classe 1 et 2 en période de faible consommation en antibiotiques (Juin 2009).

	% de souches d' <i>E. coli</i> résistantes aux antibiotiques										% <i>E. coli</i>	% <i>E. coli</i> avec le gène	
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	MAR	<i>intI1</i>	<i>intI2</i>
Effluents hôpital	2,2	22,2	0,0	2,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,2	4,4	nd	nd
Effluent STEP brut	16,7	8,3	4,2	4,2	4,2	2,1	4,2	2,1	4,2	0,0	25,2	nd	nd
Effluent STEP traité	6,0	8,0	4,0	10,0	10,0	0,0	0,0	2,0	0,0	0,0	26,0	nd	nd
Rivière (Panache STEP)	10,0	8,0	2,0	4,0	4,0	0,0	2,0	0,0	0,0	0,0	12,0	nd	nd

R1, R2,..., R10 : Résistance à un, deux,..., dix antibiotiques,

MAR : Multi-résistante aux antibiotiques (résistance à au moins 3 antibiotiques)

nd : non déterminé

Tableau 21: Contaminations en antibiotiques et enterococci résistants aux antibiotiques dans les eaux du continuum centre de soins – STEP – rivière.

Antibiotique	Hôpital		Maison de retraite		Effluent brut STEP		Effluent traité STEP		Rivière	
	Concentration ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	% enterococci résistant (N=49)	Concentration ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	% enterococci résistant (N=48)	Concentration ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	% enterococci résistant (N=49)	Concentration ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	% enterococci résistant (N=49)	Concentration ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	% enterococci résistant (N=45)
Ampicilline	0,0	100,0	0,7	87,5	0,0	19,1	0,0	19,0	0,0	4,0 ^{a,b}
Autres β -lactamines	161	-	0,0	-	0,0	-	0,0	-	0,0	-
Ciprofloxacine	73,0	75,0	0,0	100,0	0,0	15,6	0,04	17,0	0,0	5,0
Autres quinolones	68	-	59	-	0,4	-	0,1	-	0,001	-
Tétracycline	0,0	0,0	0,0	21,0	0,08	28,0	0,01	26,0	0,0	24,0
Autres Tétracyclines	1	-	0,0	-	0,07	-	0,0	-	0,0	-
Erythromycine	0,4	72,0	0,0	87,0	0,4	77,0	0,05	80,0	0,002	72,0
Autres macrolides	7,5	-	21,9	-	3,1	-	1,6	-	0,005	-

a : p-value<0,0001 comparé à l'hôpital et la maison de retraite ; **b** : p-value = 0,012 comparé à l'entrée et la sortie de la STEP ; - : Résistance aux antibiotiques non testée ; **N** : Nombre total de souches testées.

Tableau 22: Résistance à l'érythromycine et distribution des gènes de résistance aux macrolides chez les entérocoques

Site	Pourcentage d'isolats résistants à l'érythromycine ¹	Pourcentage d'isolats résistants portant le gène			
		<i>erm(B)</i>	<i>mef(A)</i>	<i>erm(B)</i> + <i>mef(A)</i>	Autres
Effluent hospitalier (N=49)	72	75	0	25	0
Effluent maison de retraite (N=48)	87	85,7	4,8	0	9,5
Effluent brut STEP (N=49)	77	12,5	18,8	25	43,7 ^a
Effluent traité STEP (N=49)	80	15,8	47,4	10,5	26,3 ^b
Rivière (N=50)	72	6,7	6,7	0	86,7 ^c

^a P < 0,0001 vs hôpital et maison de retraite

^b P < 0,0001 vs hôpital ; P = 0,28 vs maison de retraite ; P = 0,053 vs effluent brut STEP

^c P < 0,0001 vs hôpital, maison de retraite et effluents STEP

¹ : Phénotypes résistants et/ou intermédiaire

N : Nombre total de souches testées

Tableau 23 : Occurrence d'intégrases de classe 1 (*intI1*) et profils phénotypiques de résistances aux antibiotiques chez les isolats d'*E. coli* de l'effluent de la maison de retraite pour la campagne de décembre 2009.

Nombre d'isolats	<i>intI1</i>	Nombre de résistances	Profils phénotypiques
1	-	1	TET
2	1	1	TET
13	-	1	NAL
1	-	2	GEN, TET
1	1	2	AMX, NAL
1	1	2	CF, TET
1	-	2	C, NAL
1	-	2	AMX, TIC
1	1	2	AMX, NAL
1	-	3	C, TET, NAL
1	1	3	CF, TET, SXT
1	1	3	GEN, STR, TET
1	-	3	AMX, TIC, TIM
3	-	4	AMX, TIC, NAL, CIP
1	1	5	AMX, TIC, TIM, SXT, NAL
4	1	5	AMX, TIC, STR, TET, SXT
2	1	5	AMX, TIC, TIM, TET, SXT
5	1	6	AMX, TIC, TIM, STR, TET, SXT
1	-	6	AMX, TIC, TIM, STR, GEN, KAN
1	-	6	AMX, TIC, CF, STR, GEN, KAN
1	1	8	AMX, TIC, TIM, STR, C, TET, SXT, NAL

AMX: Amoxicilline; **AMC:** Amoxicilline + Acide Clavulanique; **TIC:** Ticarcilline; **TIM:** Ticarcilline + Acide Clavulanique; **CF:** Céfalotine; **STR:** Streptomycine **GEN:** Gentamycine; **KAN:** Kanamycine; **C:** Chloramphénicol; **TET:** Tetracycline; **SXT:** Sulfaméthoxazole + Trimethoprim; **NAL:** Acide Nalidixique; **CIP:** Ciprofloxacine.

5. Conclusions

En conclusion, cette étude le long du continuum hospitalier démontre que (i) la contamination des environnements aquatiques par les molécules d'antibiotiques est consécutive aux prescriptions médicales (type de molécules) et dépend de la persistance des composés et/ou métabolites ; (ii) l'émergence de bactéries fécales antibio-résistantes résulte de la pression de sélection exercée lors du traitement médicamenteux chez l'hôte ; (iii) les concentrations mesurées dans les eaux (ng.L^{-1}) sont insuffisantes pour exercer une pression de sélection responsable de l'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques (mg.L^{-1}) ; (iv) l'occurrence en *E. coli* et *Enterococcus* antibio-résistantes diminue le long du continuum avec des souches hospitalières portant des supports génétiques (intégrons, gènes *erm* et *mef*) qui disparaissent au profit de souches probablement mieux adaptées à l'environnement aquatique ; et (v) à effet thérapeutique équivalent, il pourrait être préconisé de prescrire des molécules rapidement dégradées dans les eaux (ex : amoxicilline).

En perspectives de ces travaux, des prélèvements de sédiments ont été réalisés en parallèle à un suivi de masse d'eau, à l'aval de la STEP jusqu'à la confluence avec la Seine afin d'étudier le devenir des résidus d'antibiotiques persistants adsorbés aux particules, et des bactéries fécales antibio-résistantes déposées sur les vasières, par la détection moléculaire de gènes d'antibio-résistance dans l'ADN total.

6. Articles

Article 1 :

“Evidence for a complex relationship between antibiotics and antibiotic-resistant *Escherichia coli*: from medical center patients to a receiving environment”

Kenny Oberlé, Marion-Justine Capdeville, Thierry Berthe, Hélène Budzinski, Fabienne Petit

Publié dans Environmental Science & Technology, 2012, volume 45, pp. 1859 - 1868

Evidence for a Complex Relationship between Antibiotics and Antibiotic-Resistant *Escherichia Coli*: From Medical Center Patients to a Receiving Environment

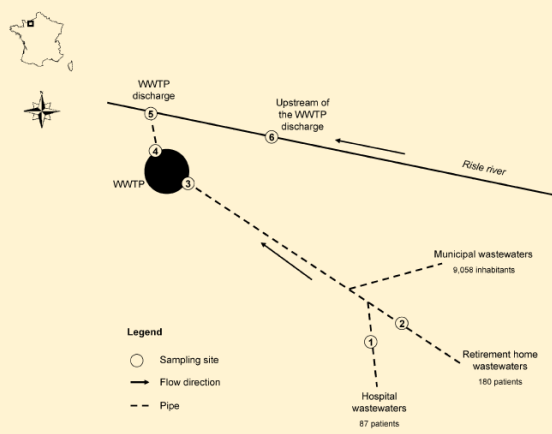
Kenny Oberlé,^{†,*} Marion-Justine Capdeville,[‡] Thierry Berthe,[†] Hélène Budzinski,[‡] and Fabienne Petit[†]

[†]Université de Rouen, UMR CNRS 6143 M2C, FED SCALE 4116, UFR des Sciences, IRESE, place Emile Blondel, 76821 Mont Saint-Aignan cedex, France

[‡]Université Bordeaux 1, UMR CNRS 5805 EPOC-LPTC, 351 cours de la Libération, 33405 Talence cedex, France

Supporting Information

ABSTRACT: The aim of this study was to investigate the relationship between antibiotics and antibiotic-resistant fecal bacteria (*E. coli*) in water along a medical center–wastewater treatment plant–river continuum (4 km). A multiresidue chemical analysis methodology, using solid phase extraction coupled with liquid chromatography tandem mass spectrometry, was performed to detect whether low levels of contamination by 34 antibiotics were related to antibiotic resistance of *E. coli* and antibiotic use. The contamination of water by antibiotics and antibiotic-resistant *E. coli* decreased along the continuum. Although amoxicillin was predominantly prescribed, only ofloxacin ($1 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$) and sulfamethoxazole ($4 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$) persisted in the river. At the retirement home, in the medical center, even though no tetracycline and sulfamethoxazole were consumed, the highest occurrences of antibiotic resistance were in classes of quinolones (42.0%), sulfonamides (24.0%), tetracyclines (38.0%), and penicillins (38.0%), mainly due to the presence of multiple antibiotic-resistance genes on class 1 integrons. Along the continuum, the occurrence of *E. coli* resistant to antibiotics and those carrying class 1 integrons decreased in water samples (p -value < 0.001). Interestingly, in the river, only persistent antibiotic compounds (ofloxacin, sulfamethoxazole) were found, but they did not correspond to the major resistances (tetracycline, amoxicillin) of *E. coli*.



1. INTRODUCTION

Massive antibiotic use in human and veterinary medicine is accompanied by the emergence of bacterial resistance regarded as a major problem for public health on a worldwide scale by the World Health Organisation. In Europe, about 10 000 tonnes of antibiotics are consumed per year,¹ and are used equally by veterinary (prophylaxis, growth promoting up to 2006 in France) and as human medicines. After antibiotic use, a large proportion of the antibiotics absorbed are excreted into the environment via urine and feces in nonmetabolized forms or coupled with polar molecules.² Thus, antibiotics and their degradation products are regarded as emergent contaminants of aquatic environments.^{3–5}

Numerous studies in Europe, U.S., and Australia are based on the detection of 10–28 antibiotic compounds collected in water samples independent from each other. These studies have shown that concentrations of quinolones, sulfonamides, tetracyclines, macrolides, lincosamids or β -lactams, ranged from about $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ in hospital effluents, to about $100 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ in WasteWater Treatment Plant (WWTP) effluents and to

about $10 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ in surface waters.^{4–11} Due to the high dilution of antibiotic compounds in waters and the fate of these compounds in such environments, these results differed according to the sensitivity of the chemical analysis methodology. Sorption, photolysis, hydrolysis, thermolysis, technical oxidation processes, and biodegradation are all involved in their fate.¹² Thus, sulfonamides and fluoroquinolones are the most persistent whereas the β -lactams show the least persistence.¹³ Whatever the antibiotic compound, except in treated effluents in China or India,^{14–16} the concentrations found in waters are lower than the minimal inhibitory concentration (MIC), responsible for the emergence of antibiotic-resistant bacteria, mainly in human and animal gastrointestinal tracts. Indeed, it has been demonstrated that MICs have values ranging from $0.032 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ to greater than $256 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for fluoroquino-

Received: September 28, 2011

Revised: December 22, 2011

Accepted: January 3, 2012

Published: January 3, 2012

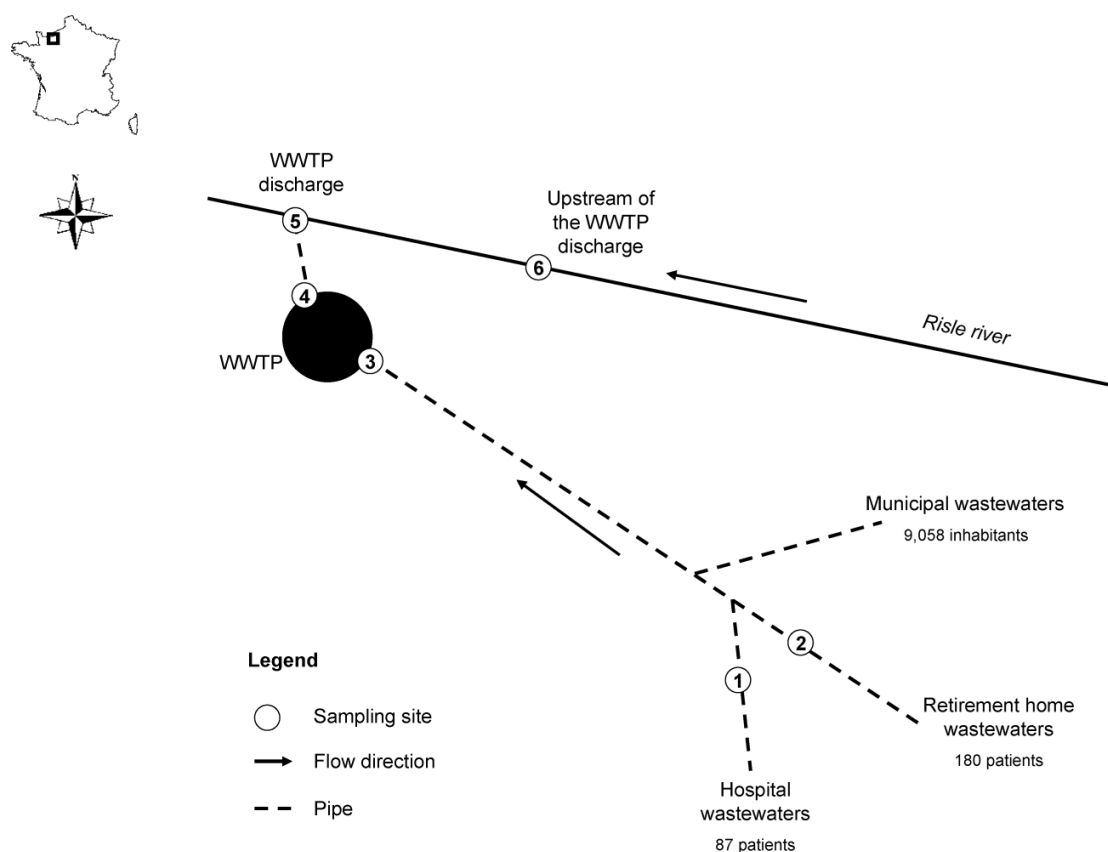


Figure 1. Flowchart of the studied zone.

lones-resistant *Escherichia coli* (*E. coli*) isolated in hospital effluents.³ However, it has recently been shown that subinhibitory or sublethal concentrations ($0.9 \times \text{MIC}$ to $0.25 \times \text{MIC}$) can trigger transcription of bacteria and be involved in quorum sensing or mutagenesis.^{17–19} Even though the effect of antibiotic exposure on bacteria is concentration-dependent, few studies have been carried out either (i) on the effect of chronic exposure to low concentrations in environmental waters of several antibiotics or other pharmaceutical drugs, or (ii) on the effect of antibiotics added to an exposure to multiple chemical contaminants (e.g., metals) in the same environment.

In addition to the input of antibiotic compounds in waters, antibiotic-resistant fecal bacteria selected in human and/or animal gastrointestinal tracts may also contaminate aquatic environments.^{20,21} The most important sources of antibiotic-resistant fecal bacteria are effluents of wastewater treatment plant (WWTP) and the direct discharges in the countries which do not treat their wastewaters.^{3,22} The second well-known contribution of antibiotic-resistant fecal bacteria is due to both soil leaching and run-offs, for which the quantities and the frequencies depend on the hydrology and the use of the watershed.²³ Whereas all these studies give information about the abundance of the inputs of antibiotic-resistant bacteria according to their origin, little is known about the evolution of this contamination in aquatic environments from the source of contamination to the river, especially concerning the added contamination by antibiotic compounds.

Among fecal bacteria, *E. coli* is one of the two bacterial indicators selected to assess the microbiological risk in waters. Thus, the quantification of *E. coli* allows the assessment of the probability of the presence of pathogenic microorganisms of fecal origin in water. The survival of this bacterial indicator depends on the grazing by protozoans and their ability to overcome environmental stress, such as low temperatures or oligotrophy.²⁴ Nevertheless, the consequences of the input of genetic contents of *E. coli* in the environment was never really estimated, whereas it was reported that input of *E. coli* in water could also be a source of antibiotic-resistance genes, particularly of the class 1 integrons which are involved in the spread of multiple-resistance to antibiotics among pathogenic bacteria.²⁵

The aim of this study, based on a multidisciplinary approach associating chemists, hydrologists and microbiologists, was to investigate the relationship between antibiotics and antibiotic-resistant *E. coli* in waters along a medical center–WWTP–river continuum (4 km) during a period of maximal antibiotic prescription by medical practitioners. In order to access antibiotic use in the studied zone, medical center pharmacists and general practitioners were involved in this study. The used sampling strategy allowed us to follow the evolution of antibiotic resistance of the *E. coli* population along the continuum. The detection of antibiotic compounds in waters was performed with a multiresidue chemical analysis methodology, using solid phase extraction (SPE) coupled with liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS-MS). This analytical methodology is a powerful technique to detect

Table 1. Sampling Strategy and *E. coli* Contamination along the Medical Center–Wastewater Treatment Plant–River Continuum^a

	medical center		wastewater treatment plant		river
	hospital	retirement home	influent	effluent	
sampling site (no.)	1	2	3	4	5
population density	87 patients	180 patients	9058 inhabitants/267 patients	WWTP discharge	NR
frequency of antibiotic use	++	+	±	NR	NR
mean residence time of patients	4 to 28 days	10 years	NR	NR	NR
sampling conditions	averaged sample (21 h)	averaged sample (24 h)	averaged sample (24 h)		averaged sample (16 h)
flow	1 m ³ ·h ⁻¹	1 m ³ ·h ⁻¹	4300 m ³ ·d ⁻¹	6.5 ± 0.4 × 10 ⁴	10.7 m ³ ·s ⁻¹
<i>Escherichia coli</i> (CFU.100 mL ⁻¹)	8.3 ± 3.5 × 10 ⁴	1.9 ± 0.3 × 10 ⁶	3.5 ± 2.6 × 10 ⁶	2.6 ± 0.6 × 10 ³	5.8 ± 0.4 × 10 ³

^aNR: Not Relevant. ++: High antibiotic use during the stay of patients. +: Several antibiotic treatments over the long-term stay of patients. ±: Inhabitants can be under antibiotic treatment during the sampling period.

low levels of 34 antibiotics contamination in comparison with (i) antibiotic resistance of *E. coli* and (ii) antibiotic use.

2. EXPERIMENTAL SECTION

2.1. Study Sites and Sampling Strategy. Occurrence of antibiotics and the antibiotic-resistance of *E. coli* populations was investigated along a continuum formed by a medical center, a WWTP and a river in the North-West of France (Figure 1). During a high epidemic period corresponding to maximal antibiotic use due to illness outbreaks (December 2009), samples were collected along the pathway from medical center effluents to a river impacted by a WWTP (Table 1) using autosamplers (ISCO 6700s, Roucaire, Courtaboeuf, France). The high antibiotic use period was determined in partnership with both the medical center pharmacists and town pharmacies (six pharmacies), because in France antibiotic compounds can only be prescribed by medical practitioners. The first site consisted in a medical center with both a hospital (87 beds) and a retirement home (180 beds), which is the only one medical center in the study zone. The residence time of patients in the hospital was from 4 to 28 days and an average of 10 years in the retirement home. In the retirement home, patients were not always under permanent antibiotic treatment, but could be treated several times during their stay. Effluent samples from the hospital (sampling site no. 1) and the retirement home (sampling site no. 2) were collected at two discharge points before the main sewer. The second site, located 4 km away from the medical center, was the town's wastewater treatment plant (WWTP), which collects the wastewaters of the medical center and of 9058 inhabitants. The WWTP treatment consisted in a primary treatment with a screen, an aerated grit-removal tank and a primary clarifier. The secondary treatment was an activated sludge system and a second clarifier. Mean daily wastewater samples were collected at the entrance (sampling site no. 3) and the outlet (sampling site no. 4) of the WWTP. The third site, located 4.1 km away from the medical center, was the WWTP discharge in the river (sampling site no. 5 located at 4 m from the WWTP outlet). Finally, the upstream of the river (sampling site no. 6) before the discharge of the WWTP was sampled during a similar period. All the samples were collected as follows: hospital wastewaters (1 liter every hour for 24 hours), retirement home wastewaters (1 liter every hour for 21 hours), WWTP influent and effluent (1 liter every hour for 24 hours), and for the river (1 liter every hour for 16 hours for discharge of the WWTP,

and 1 liter every hour for 24 hours upstream from the WWTP). The mean daily sample consists of a mixture subsamples (1 flask of 1 liter every hour) of identical volume (250 mL) collected during the sampling period (from 16 h to 24 h). Samples were collected in polyethylene flasks for microbiological analyses and in 4 glass and 2 amber glass flasks for chemical analyses. Samples were stored at 4–6 °C and microbiological analysis was carried out within 8 h. For chemical analysis, samples were first filtered and then frozen at –20 °C until analysis was performed.

2.2. Detection and Quantification of Antibiotics in Water Samples. **2.2.1. Molecules Studied.** We chose 34 antibiotic molecules, generally used against Gram negative bacteria, for this study on the basis of consumption data, ecotoxicity analysis, and detection of molecules in previous studies.^{4,5} The antibiotics chosen are mentioned in Table 2.

2.2.2. Sample Pretreatment and Solid-Phase Extraction. Samples were first filtered on a 1.6 µm and then on a 0.7 µm glass fiber filter (GF/A and GF/F filter, Whatman) within 48 h after sampling. Once liquid and particulate phases separated, samples were frozen until analysis. The antibiotics were extracted from water by solid phase extraction (SPE) practiced with Oasis HLB (200 mg, 66 cc) cartridges. Sample pH was adjusted to 7 and a few milliliters of a 250 mM Na₂-EDTA solution were added. The final concentration of EDTA in the samples was 10 mM. The addition of EDTA modified the pH which decreased to 5. The cartridges were conditioned with 5 mL of acetonitrile (ACN) then 5 mL of natural mineral water at pH 7. We loaded 100 mL of medical center effluents and WWTP influent, 200 mL of WWTP effluent and 300 mL of surface water samples onto cartridges. After drying for one hour, the cartridges were eluted with 5 mL of a mixture of H₂O/ACN (40/60, v/v). The samples were then concentrated under a nitrogen stream at 40 °C and transferred into injection vials. Just before the analysis, the residues were dissolved in a 90/10 H₂O/ACN mixture.

2.2.3. Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS-MS). LC analysis was performed using an Agilent 1200 RRLC (rapid resolution liquid chromatography) coupled with an Agilent QQQ 6410 triple quadrupole mass spectrometer with an electrospray ionization source. Chromatographic separation was achieved on a Zorbax SB C₁₈ column. Mobile phases were ultra pure water and acetonitrile. Formic acid (0.3%) and acetic acid (0.1%) were added to each of the two solvents in positive and negative ionization mode respectively. Molecules were followed in MRM mode (multi

Table 2. Detection and Quantification of Each Antibiotic Molecule Tested along the Continuum^a

antibiotic molecules	limit of detection ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	limit of quantification ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	hospital effluent ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	retirement home effluent ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	WWTP influent ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	WWTP effluent ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	river ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
penicillins							
amoxicillin	1×10^{-1}	3×10^{-1}	0.8	—	d	—	—
ampicillin	4×10^{-2}	1×10^{-1}	—	0.7	—	—	—
penicillin G	4×10^{-4}	2×10^{-3}	—	—	—	—	—
penicillin V	7×10^{-4}	2×10^{-3}	—	—	—	—	—
oxacillin	5×10^{-4}	2×10^{-3}	—	—	—	—	—
cloxacillin	5×10^{-4}	2×10^{-3}	—	—	0.01	—	—
dicloxacillin	2×10^{-3}	5×10^{-3}	—	—	—	—	—
cephalosporins							
cefalexin	6×10^{-3}	2×10^{-2}	—	—	—	—	—
cefotaxim	2×10^{-3}	7×10^{-3}	160	—	0.4	0.04	—
cefepodoxim	1×10^{-1}	3×10^{-1}	—	—	—	—	—
ceftiofur	2×10^{-3}	6×10^{-3}	—	—	—	—	—
cefuroxim	3×10^{-3}	8×10^{-3}	—	—	0.2	—	—
quinolones and fluoroquinolones							
ciprofloxacin	5×10^{-4}	2×10^{-3}	73	—	—	—	—
enrofloxacin	2×10^{-4}	5×10^{-4}	—	—	—	—	—
marbofloxacin	1×10^{-4}	3×10^{-4}	—	—	—	—	—
norfloxacin	4×10^{-4}	2×10^{-3}	0.1	0.04	—	0.04	—
ofloxacin	1×10^{-4}	3×10^{-4}	68	0.08	0.4	0.1	0.001
pipemidic acid	4×10^{-4}	2×10^{-4}	—	59	0.02	—	—
oxilinic acid	1×10^{-4}	1×10^{-4}	—	—	—	—	—
flumequine	1×10^{-4}	2×10^{-4}	—	—	—	—	d
tetracyclines							
tetracycline	3×10^{-4}	1×10^{-3}	—	—	0.08	0.01	—
oxytetracycline	4×10^{-4}	2×10^{-3}	—	—	—	—	—
chlortetracycline	6×10^{-3}	2×10^{-3}	—	—	—	—	—
doxycycline	4×10^{-4}	2×10^{-3}	1	—	0.07	—	d
sulfonamides							
sulfadiazine	1×10^{-4}	3×10^{-4}	—	—	—	—	—
sulfadimethoxin	1×10^{-4}	1×10^{-4}	—	—	—	d	d
sulfamerazin	1×10^{-4}	4×10^{-4}	—	—	—	—	—
sulfamethazin	1×10^{-4}	2×10^{-4}	—	—	—	—	—
sulfamethizole	1×10^{-4}	4×10^{-4}	—	—	0.002	0.008	—
sulfamethoxazole	3×10^{-4}	1×10^{-3}	0.01	0.005	0.6	0.5	0.004
sulfanilamide	2×10^{-2}	7×10^{-2}	—	—	—	—	—
sulfapyridine	1×10^{-4}	3×10^{-4}	0.006	—	0.04	0.06	0.001
sulfathiazole	2×10^{-4}	5×10^{-4}	—	—	—	—	—
other							
trimethoprim	1×10^{-4}	3×10^{-4}	0.005	0.001	0.3	0.1	0.004

^ad: Antibiotic molecule detected but value are lower than quantification limit; —: antibiotic molecule not detected.

reaction monitoring) by two transitions (precursor ion \rightarrow product ion), once for quantification and once for confirmation. The compounds were identified by their retention time, the two transitions and the ratio between them.

2.2.4. Protocol Validation. In the validation procedure of the analytical method, the following criteria, sensitivity (detection limits), linearity, precision (repeatability and reproducibility), accuracy and recovery, were considered. Detection and quantification limits were determined as the minimum detectable amount of analyte which gave respectively peaks of 10 and 30. Instrumental detection limits (IDL) were defined by the direct injection of standard stock solution and are expressed in injected picograms. Method detection limits (MDL) were defined by extrapolation, using the extracted volume and the concentration factor, of a natural mineral water, free from targeted compounds, spiked with the stock standard

solution and having undergone the whole extraction and analytical protocol. IDL varied between 0.2 and 37 pg injected. MDL varied between 0.1 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ and 100 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$. MDL were checked on real samples using isotopic dilution methodology. Linearity was evaluated through serial dilutions of a stock standard solution mixture of the 34 compounds (30–1200 pg injected) using the regression coefficient. When the linearity was not good enough ($R^2 < 0.999$) over the entire range, the smallest values were used (bracket method). Precision corresponds to the analytical response variability. It was evaluated through successive injections of the same standard solution (intraday variability) or through the injection of a solution prepared in exactly the same way but injected on different days. Intraday variability was less than 10% and interday variability was around 50%. The accuracy of the method corresponded to the adequate quantification between

Table 3. Inputs of Antibiotics and Antibiotic-Resistant *E. coli* by the River at the Upstream of the WWTP Discharge^a

antibiotic molecules	limit of detection ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	limit of quantification ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	antibiotic concentration ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	<i>E. coli</i> antibiotic resistance (n/N)
penicillins				
amoxicillin	1×10^{-1}	3×10^{-1}	—	6/45
cloxacillin	5×10^{-4}	2×10^{-4}	—	NT
ticarcillin	NR	NR	NT	5/45
other penicillins	see Table 2	see Table 2	—	NT
cephalosporins				
cefotaxim	2×10^{-3}	7×10^{-3}	—	0/45
cefuroxim	3×10^{-3}	8×10^{-3}	—	NT
cefalotin	NR	NR	NT	1/45
other cephalosporins	see Table 2	see Table 2	—	NT
quinolones and fluoroquinolones				
ciprofloxacin	5×10^{-4}	2×10^{-3}	—	0/45
norfloxacin	4×10^{-4}	2×10^{-3}	—	NT
ofloxacin	1×10^{-4}	3×10^{-4}	0.002	NT
pipemedic acid	4×10^{-4}	2×10^{-4}	—	NT
nalidixic acid	NR	NR	NT	0/45
other quinolones and fluoroquinolones	see Table 2	see Table 2	—	NT
tetracyclines				
tetracycline	3×10^{-4}	1×10^{-3}	0.001	4/45
doxycycline	4×10^{-4}	2×10^{-3}	—	NT
other tetracyclines	see Table 2	see Table 2	—	NT
sulfonamides				
sulfadimethoxin	1×10^{-4}	1×10^{-4}	0.001	NT
sulfamethizole	1×10^{-4}	4×10^{-4}	—	NT
sulfamethoxazole	3×10^{-4}	1×10^{-3}	0.003	3/45
sulfapyridine	1×10^{-4}	3×10^{-4}	0.001	NT
other sulfonamides	see table 2	see Table 2	—	NT

^an: Number of antibiotic-resistant *E. coli*. N: Total number of *E. coli* isolates tested. —: antibiotic molecule not detected; NT: antibiotic molecule or antibiotic resistance not tested. NR: not relevant.

theoretical and measured concentration of standard solutions injected at different concentration levels. This was $102 \pm 6\%$. The whole protocol recoveries were determined by spiking natural mineral waters, free from targeted compounds, which then underwent the whole extraction and analytical protocol. The average recovery was $55\% \pm 20\%$ ($n = 10$).

2.3. Enumeration and Isolation of Culturable *Escherichia coli*. *E. coli* were enumerated using membrane filtration methods (0.45 μm HA047 Millipore, Bedford, MA) and isolated from the water samples with a selective chromogenic media specific for *E. coli*, with the addition of a selective supplement for water samples (RAPID[®] *E. coli* 2 Medium and Supplement; Biorad, Hercules, CA). They were incubated for 24 h at 44 °C according to standard methods NF ISO 9308-3. The threshold value for the enumeration of *E. coli* in water was 5 CFU per 100 mL.

293 *E. coli* isolates were obtained along the continuum and in upstream of the river during the high antibiotic use period (December 2009). The isolates (one for each *E. coli* strain) were taken from the membrane of the RAPID[®] *E. coli* 2 medium and isolated on this medium for 24 h at 44 °C. Each *E. coli* isolate was stored on a cryo-bead system (AES laboratory, France) at -80 °C.

2.4. *E. coli* Antibiotic Resistance Testing. *E. coli* antibiotic resistance was determined by the agar diffusion method using 12 antibiotic discs (BioMérieux, France). The antibiotics tested here are the most common drugs used in France in the treatment of infections caused by Gram negative bacilli: amoxicillin (25 μg), amoxicillin + clavulanic acid (20 μg

+ 10 μg), ticarcillin (75 μg), ticarcillin + clavulanic acid (75 μg + 10 μg), cefalotin (30 μg), ceftazidim (30 μg), cefotaxim (30 μg), imipenem (10 μg), tetracycline (30 μg), trimethoprim + sulfamethoxazole (1.25 μg + 23.75 μg), nalidixic acid (30 μg), and ciprofloxacin (5 μg). After 24 h of incubation at 37 °C, the bacteria were classified as sensitive, intermediate or resistant, according to the French National Guidelines (Comité de l'antibiogramme de la SFM, 2001). The *E. coli* CIP 7624 (ATCG 25922) was used as a control. The multiple antibiotic-resistance was determined for *E. coli* strains resistant to three or more antibiotics because some genes confer several resistances, such as β -lactamases for amoxicillin/ticarcillin resistances.²⁶

2.5. PCR Amplification of Integrase Genes. Cell suspensions were prepared with two or three colonies in 100 μL of sterile water and total bacterial DNA was extracted by boiling (10 min at 95 °C). Two *E. coli* strains, one carrying class 1 integrons, the other carrying class 2 integrons, were used as positive controls. PCRs were carried out with the specific primers int1.F/int1.R²⁷ for the class 1 integrase, int2.F/int.2R²⁸ for the class 2 integrase as previously described by the authors.

2.6. Statistical Analyses. The percentages of *E. coli* strains resistant to at least one antibiotic and those carrying class 1 integrons in the water samples were compared using the chi-square test. Tests were carried out using the XLSTATS version 6.0 (Addinsoft).

Table 4. Relationship between Antibiotics and Antibiotic-Resistant *E. coli* in Effluents of Medical Center^a

antibiotic molecules	hospital effluents			retirement home effluents		
	antibiotic use ^b (g)	antibiotic concentration ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	<i>E. coli</i> antibiotic resistance (n/N)	antibiotic use ^b (g)	antibiotic concentration ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	<i>E. coli</i> antibiotic resistance (n/N)
penicillins						
amoxicillin	1930	0.8	5/50	175	—	19/50
ampicillin	0	—	NT	0	0.7	NT
cloxacillin	0	—	NT	0	—	NT
ticarcillin	0	NT	5/50	0	NT	19/50
other penicillins	18	—	NT	0	—	NT
cephalosporins						
cefotaxim	180	160	0/50	0	—	0/50
cefalotin	0	NT	1/50	0	NT	3/50
other cephalosporins	273	—	NT	55	—	NT
quinolones & fluoroquinolones						
ciprofloxacin	18	73	4/50	0	—	3/50
norfloxacin	21	0.1	NT	5.2	0.04	NT
ofloxacin	30.7	68	NT	7.6	0.08	NT
pipemidic acid	0	0	NT	0	59	NT
nalidixic acid	0	NT	3/50	0	NT	21/50
other quinolones and fluoroquinolones	105.6	—	NT	0	—	NT
sulfonamides						
sulfamethoxazole	0.3	0.01	1/50	0	0.005	12/50
sulfapyridine	0	0.006	NT	0	—	NT
other sulfonamides	0	—	NT	0	—	NT
tetracyclines						
doxycycline	1.1	1.0	NT	0	—	NT
tetracycline	0	—	8/50	0	—	19/50
other tetracyclines	0	—	NT	0	—	NT

^a—: antibiotic molecule not detected; NT: antibiotic molecule or antibiotic resistance not tested. ^bAntibiotic use one month before sampling.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Contamination of Waters by Antibiotics and *E. coli* along the “Medical Center–WWTP–River” Continuum.

Water contamination was investigated along the medical center–WWTP–river continuum. On the one hand, the contamination of waters by *E. coli* increased with the population density which evolves, in this study, from 267 patients at the medical center (high antibiotic use) to 9058 inhabitants, with flows from $1 \text{ m}^3\cdot\text{h}^{-1}$ (medical center effluents) to $10.7 \text{ m}^3\cdot\text{s}^{-1}$ in the river (Table 1). On the other hand, the abundance of *E. coli* decreased from the WWTP influent ($3.5 \pm 2.6 \times 10^6 \text{ CFU}\cdot 100 \text{ mL}^{-1}$) to the discharge of the WWTP into the river ($2.6 \pm 0.6 \times 10^3 \text{ CFU}\cdot 100 \text{ mL}^{-1}$) due to the elimination of bacteria during the treatment of wastewaters and both dilution and loss of culturability in the river, as previously shown in similar environments.^{22,29}

Because the MDL ($0.1\text{--}100 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$) were under or of the same order of magnitude as environmental antibiotic concentrations usually found in other studies,¹² the developed protocol is suitable to monitor low concentrations (trace levels) of antibiotic compounds in water. Moreover, with only one single extraction step despite targeting a relatively important number of compounds (34), in comparison with similar studies which have focused on 28 antibiotics in Watkinson et al.,⁵ 25 antibiotics in Gros et al.,³⁰ or in Focazio et al.,³¹ or 23 antibiotics in Tuc Dinh et al.,³² our methodology remained simple but efficient (average extraction recovery 55%) since it combined fairly well rapidly (one extraction step, one 50-min-long analysis in ESI+ for 27 molecules and one 18-min-long

analysis in ESI- for 7 molecules) with sensitivity ($0.1 < \text{MDL} < 100 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$) and selectivity (MRM mode). Out of the 34 antibiotic compounds tested for in the water samples collected along the continuum, only 15 were detected (Table 2). Individual concentrations varied from $5 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ for trimethoprim to $160 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for cefotaxim in hospital effluent, from $1 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ for trimethoprim to $59 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for pipemidic acid in retirement home effluent, from $2 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ for sulfamethizole to $614 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ for sulfamethoxazole in WWTP raw water and from $8 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ (sulfamethizole) to $500 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ (sulfamethoxazole) in WWTP treated water. Eight antibiotics were detected in the river at individual concentration less than $5 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$. Ofloxacin, sulfamethoxazole and trimethoprim were detected in all samples from the contamination sources to the receiving environment. These three antibiotic compounds were also detected upstream from the WWTP discharge (Table 3). These results highlight that antibiotic contamination of waters could be due to other sources than WWTP, for example, agricultural runoffs or direct discharge of nontreated wastewaters. However, there was no cumulative effect of antibiotics in water column because concentrations were in the same order of magnitude.

Relationship between Antibiotic Use, Antibiotic Contamination and Antibiotic-Resistant *E. coli* along the Continuum. Antibiotic use for each antibiotic compound was compared with both antibiotic concentrations and antibiotic-resistant *E. coli* in effluents from a hospital and a retirement home (Table 4). At the hospital, where patients stay a short time, four antibiotic classes were prescribed: quinolones, sulfonamides, penicillins, cephalosporins. At the retirement home, where people stay an average of 10 years, only three

Table 5. Occurrences of Antibiotic Resistance, Multiple Antibiotic Resistance and Class 1 and 2 Integrons in *E. coli* in Waters^a

	% of <i>E. coli</i> resistant to at least one antibiotic	% of multiple ^b antibiotic-resistant <i>E. coli</i>							% of class 1 integrons	% of class 2 integrons
		R3	R4	R5	R6	R7	R8	% MAR		
hospital effluent	16.0	0.0	2.0	0.0	2.0	4.0	2.0	10.0	6.0	0.0
retirement home effluent	82.0***	6.0	6.0	8.0	16.0	0.0	2.0	38.0	36.0***	0.0
WWTP influent	44.9	2.0	6.1	0.0	10.2	2.0	2.0	22.3	16.4	0.0
WWTP effluent	24.5	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	4.1	14.1	8.2	2.0
river (WWTP discharge)	26.0***	4.0	2.0	2.0	4.0	2.0	0.0	14.0	8.0***	0.0
inputs upstream from WWTP discharge	22.2	2.2	2.2	6.7	0.0	0.0	0.0	11.1	4.4	2.2

^aR3 to R9: Resistances from three to nine antibiotics. %MAR: Percentage of multiple antibiotic resistant *E. coli*. χ^2 test, p -value <0.001. ^bMultiple antibiotic-resistance of *E. coli* is defined by at least three resistances to antibiotics. ^c $\alpha = 0.05$.

antibiotic classes were prescribed: quinolones, penicillins, and cephalosporins. Among these antibiotic classes, the most frequently prescribed compound (amoxicillin) was detected in effluents at rather low concentration ($0.8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), most likely due to degradation in water, through hydrolysis.³³ In contrast, ciprofloxacin, ofloxacin (fluoroquinolones class) and cefotaxim (cephalosporins class), which were less frequently prescribed, were detected at high concentrations, respectively $73 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $68 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, and $160 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ in hospital effluents. Sulfamethoxazole and doxycycline were detected in hospital effluents even though these antibiotic compounds were not often prescribed. It must be noted that in our study sulfapyridine was detected in hospital effluents and ampicillin, pipemedic acid, and sulfamethoxazole in retirement home effluents, although these antibiotic compounds were not prescribed by hospital doctors. The presence of these compounds could be explained by uncontrolled inputs from hospital employees (100 persons per day) and/or visitors. Thus, the results show that the potential for contamination of antibiotics in water environment is of course mainly consecutive to the medical prescription, but most of all to the stability of the antibiotic compound once released in this environment.^{5,15,16,33}

For further analysis, occurrence and phenotypic analyses of antibiotic-resistant strains in *E. coli* population were compared with the different antibiotic compounds used and detected in the effluents. Although the use of antibiotics is higher at the hospital, the percentages of *E. coli* resistant to at least one antibiotic and multiple-resistant (from three to eight resistances) were greater in the effluents of the retirement home, respectively 82.0% and 38.0% than in the hospital effluents, respectively 16.0% and 10.0% (Table 5). The rehearsed use of antibiotics by the patients of the retirement home during their long-term stay demonstrated the effect of antibiotic use on the selection of antibiotic-resistant bacteria in the human gastro-intestinal tract, as explained by Tenaillon et al.²¹ Thus, in the *E. coli* population isolated from retirement home effluents, the highest occurrences of antibiotic resistance were to quinolones/fluoroquinolones class (42.0%), sulfonamides class (24.0%), tetracyclines class (38.0%), and penicillins class (38.0%). Whereas the resistances to amoxicillin and sulfamethoxazole correspond to the compounds prescribed by medical practitioners, ticarcillin, cefalotin, nalidixic acid, and tetracycline were not used at all in our study. However, the analysis of the antibiotic resistance patterns of *E. coli* strains isolated in the retirement home effluents has shown that 15 out of 50 isolates (30.0%) were resistant to both used (amoxicillin) and nonused (sulfamethoxazole, tetracycline, and nalidixic acid)

antibiotic compounds (Table 6). Among these 15 isolates, we showed that 12 *E. coli* strains carried class 1 integrase gene, for

Table 6. Antibiotic-Resistance Patterns and Occurrence of Class 1,2 Integrons in *E. coli* Isolated in Retirement Home Effluents^a

number of isolates	Int 1 gene	number of resistances	antibiotic resistance patterns
1	—	1	TET
2	1	1	TET
13	—	1	NAL
1	—	2	GEN, TET
1	1	2	AMX, NAL
1	1	2	CF, TET
1	—	2	C, NAL
1	—	2	AMX, TIC
1	1	2	AMX, NAL
1	—	3	C, TET, NAL
1	1	3	CF, TET, SXT
1	1	3	GEN, STR, TET
1	—	3	AMX, TIC, TIM
3	—	4	AMX, TIC, NAL, CIP
1	1	5	AMX, TIC, TIM, SXT, NAL
4	1	5	AMX, TIC, STR, TET, SXT
2	1	5	AMX, TIC, TIM, TET, SXT
5	1	6	AMX, TIC, TIM, STR, TET, SXT
1	—	6	AMX, TIC, TIM, STR, GEN, KAN
1	—	6	AMX, TIC, CF, STR, GEN, KAN
1	1	8	AMX, TIC, TIM, STR, C, TET, SXT, NAL

^aAMX: amoxicillin; AMC: amoxicillin + clavulanic acid; TIC: ticarcillin; TIM: ticarcillin + clavulanic acid; CF: cefalotin; STR: streptomycin; GEN: gentamycin; KAN: kanamycin; C: chloramphenicol; TET: tetracycline; SXT: sulfamethoxazole + trimethoprim; NAL: nalidixic acid; CIP: ciprofloxacin.

which the most frequently described resistance genes have been the resistance-gene cassettes for aminoglycosides (*aad* genes), trimethoprim (*dfr* genes), and the resistance gene for sulfonamides (*sul* gene).^{28,34–36} In addition, tetracycline-resistant strains must carry this gene on plasmids or transposons.³⁷ The presence of these genetic elements shows the complex relationship between antibiotic use and antibiotic-resistance of *E. coli* and demonstrates that it is not possible to explain an antibiotic-resistance phenotype based on antibiotic use only. Indeed, it has been shown that resistance genes are

Table 8. Mean Quantities^a of Antibiotics Prescribed by General Practitioners (Per Gram)

antibiotic class	antibiotic molecule	mean quantity prescribed by general practitioners (per gram)
penicillins	amoxicillin	258430
	oxacillin	650
	cloxacillin	736
cephalosporins	cefaclor	398
	cefixime	541
	cefepodoxim	2505
quinolones & fluoroquinolones	ciprofloxacin	980
	moxifloxacin	254
	lomefloxacin	24
	norfloxacin	656
	ofloxacin	88
	pefloxacin	2
	pipemedic acid	56
	levofloxacin	195
sulfonamides	sulfamethoxazole	902
tetracyclines	doxycycline	1562

^aMean quantities calculated for each pharmacy during a high antibiotic consumption period (October 2009 to March 2010).

Occurrence of Antibiotic-Resistant *E. coli* and Class 1 Integrase Gene from the Contamination Sources to the Receiving Environment. Along the “medical center–WWTP–river” continuum we showed that *E. coli* resistant to at least one antibiotic and those carrying the class 1 integrase gene, decreased significantly (p -value < 0.001) from the retirement home effluents, respectively 82.0% and 36.0%, to the river, respectively 26.0% and 8.0% (Table 5). In the receiving environment (river), no class 2 integrase gene was detected in *E. coli* isolates, probably due to a lower population density in our watershed. The percentage of class 1 integrons found in the same sample was of the same order of magnitude as observed in previous studies, which highlighted that 10.0% and 13.0% of *E. coli* strains isolated from rivers carried the class 1 integrase gene.^{34,41} Upstream from the WWTP discharge, we showed that *intI1* positive isolates (4.4%) were lower than those in the WWTP discharge into the river. These results are consistent with a similar study which also demonstrates the decrease of the occurrence of *E. coli* class 1 integrons along a continuum formed by clinical samples (56.0%), WWTP influent (15.1%), WWTP effluent (11.5%) and a river (14.0%).⁴²

Our study strengthens previous reports on the discharge of antibiotic-resistance genes directly related to resistance phenotypes of *E. coli* isolates that harbor integrase genes. Once in waters, the particulate-associated *E. coli* and corresponding antibiotic-resistance genes are deposited on mudflats, as previously described in Cache La Poudre river, Colorado.^{43,44} In this work, we have demonstrated that (i) both occurrences of antibiotic-resistant *E. coli* and antibiotics decreased along the medical center–WWTP–river continuum and (ii) a simple relationship does not exist between the most detected antibiotics in waters and the most frequently used antibiotics. This study has shown that antibiotic-resistant *E. coli*

is acquired in the gastro-intestinal tract of patients treated over the long-term, that these resistant strains and their corresponding genes spread out in waters, and that those genes could be accumulated in high levels in aquatic environments.⁴³ Up to now, it has never been shown that antibiotic concentrations of the order of 10 ng·L⁻¹ could select antibiotic-resistant bacteria; however, this emerging contaminant persists in the aquatic environment in addition to other pharmaceuticals and metals. Thus, it could be suggested that, with the same therapeutic efficiency, antibiotics which are highly degraded in waters should be used. This would at least limit the putative ecotoxicological risk of antibiotics for aquatic environments. Nevertheless, other measures will have to be proposed if we are to eliminate bacterial resistance to antibiotics.

■ ASSOCIATED CONTENT

■ Supporting Information

Additional information as noted in the text. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

■ Corresponding Author

*Phone: (33) 2 35 14 66 39; fax: (33) 2 35 14 66 88; e-mail: kenny.oberle@etu.univ-rouen.fr.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the scientific program FLASH–Seine Aval (<http://seine-aval.crihan.fr/web/>) and by the CNRS EC2CO. The first author held a research grant (REIVE) from the Haute-Normandie Regional Council (France). We thank Caroline Bance and Michel Simon for their technical assistances; Dilys Moscato for helpful comments on the manuscript; Michel Leroux, Aurélie Lamy, Yvon Goarvot, Sophie Coté and downtown pharmacists for antibiotic consumption data, the people that let us access to the medical center and the WWTP.

■ REFERENCES

- (1) Kümmerer, K. Significance of antibiotics in the environment. *J. Antimicrob. Chemother.* **2003**, *52* (1), 5–7.
- (2) Chambers, H. F., Antimicrobial agents: Protein synthesis inhibitors and miscellaneous antibacterial agents. In *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*; New York: McGraw-Hill 2001; pp 1239–1271.
- (3) Duong, H. A.; Pham, N. H.; Nguyen, H. T.; Hoang, T. T.; Pham, H. V.; Pham, V. C.; Berg, M.; Giger, W.; Alder, A. C. Occurrence, fate and antibiotic resistance of fluoroquinolone antibacterials in hospital wastewaters in Hanoi, Vietnam. *Chemosphere* **2008**, *72* (6), 968–973.
- (4) Tamtam, F.; Mercier, F.; Le Bot, B.; Eurin, J.; Tuc Dinh, Q.; Clément, M.; Chevreuil, M. Occurrence and fate of antibiotics in the Seine River in various hydrological conditions. *Sci. Total Environ.* **2008**, *393* (1), 84–95.
- (5) Watkinson, A. J.; Murby, E. J.; Kolpin, D. W.; Costanzo, S. D. The occurrence of antibiotics in an urban watershed: From wastewater to drinking water. *Sci. Total Environ.* **2009**, *407* (8), 2711–2723.
- (6) Brown, K. D.; Kulis, J.; Thomson, B.; Chapman, T. H.; Mawhinney, D. B. Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico. *Sci. Total Environ.* **2006**, *366* (2–3), 772–783.
- (7) Hernando, M. D.; Mezcu, M.; Fernandez-Alba, A. R.; Barcelo, D. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta* **2006**, *69* (2), 334–342.

- (8) Hirsch, R.; Ternes, T.; Haberer, K.; Kratz, K. L. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Sci. Total Environ.* **1999**, *225* (1–2), 109–118.
- (9) Karthikeyan, K. G.; Meyer, M. T. Occurrence of antibiotics in wastewater treatment facilities in Wisconsin, USA. *Sci. Total Environ.* **2006**, *361* (1–3), 196–207.
- (10) Lindberg, R.; Jarnheimer, P. A.; Olsen, B.; Johansson, M.; Tysklind, M. Determination of antibiotic substances in hospital sewage water using solid phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry and group analogue internal standards. *Chemosphere* **2004**, *57* (10), 1479–1488.
- (11) Miao, X. S.; Bishay, F.; Chen, M.; Metcalfe, C. D. Occurrence of antimicrobials in the final effluents of wastewater treatment plants in Canada. *Environ. Sci. Technol.* **2004**, *38* (13), 3533–3541.
- (12) Kümmerer, K. Antibiotics in the aquatic environment—A review—Part I. *Chemosphere* **2009**, *75* (4), 417–434.
- (13) Huang, C. H.; Renew, J. E.; Pinkston, K.; Sedlak, D. L. Occurrence and fate of antibiotic compounds in municipal wastewater and animal waste. *Proc. Water Environ. Fed.* **2001**, *11*, 686–697.
- (14) Larsson, D. G.; de Pedro, C.; Paxeus, N. Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *J. Hazard. Mater.* **2007**, *148* (3), 751–755.
- (15) Li, D.; Yang, M.; Hu, J.; Ren, L.; Zhang, Y.; Li, K. Determination and fate of oxytetracycline and related compounds in oxytetracycline production wastewater and the receiving river. *Environ. Toxicol. Chem.* **2008**, *27* (1), 80–86.
- (16) Li, D.; Yu, T.; Zhang, Y.; Yang, M.; Li, Z.; Liu, M.; Qi, R. Antibiotic resistance characteristics of environmental bacteria from an oxytetracycline production wastewater treatment plant and the receiving river. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76* (11), 3444–3451.
- (17) Davies, J.; Spiegelman, G. B.; Yim, G. The world of subinhibitory antibiotic concentrations. *Curr. Opin. Microbiol.* **2006**, *9* (5), 445–453.
- (18) Fajardo, A.; Martinez, J. L. Antibiotics as signals that trigger specific bacterial responses. *Current Opin. Microbiol.* **2008**, *11* (2), 161–167.
- (19) Kohanski, M. A.; DePristo, M. A.; Collins, J. J. Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. *Mol. Cell* **2010**, *37* (3), 311–320.
- (20) Salyers, A. A.; Gupta, A.; Wang, Y. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. *TRENDS Microbiol.* **2004**, *12* (9), 412–416.
- (21) Tenaillon, O.; Skurnik, D.; Picard, B.; Denamur, E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8* (3), 207–217.
- (22) Reinthaler, F. F.; Posch, J.; Feierl, G.; Wust, G.; Haas, D.; Ruckebauer, G.; Mascher, F.; Marth, E. Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge. *Water Res.* **2003**, *37* (8), 1685–1690.
- (23) Christian, T.; Schneider, R. J.; Färber, H. A.; Skutlarek, D.; Meyer, M. T.; Goldbach, H. E. Determination of antibiotic residues in manure, soil, and surface waters. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* **2003**, *31* (1), 36–44.
- (24) Rozen, Y.; Belkin, S. Survival of enteric bacteria in seawater. *FEMS Microbiol. Rev.* **2001**, *25* (5), 513–529.
- (25) Carattoli, A. Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Vet. Res.* **2001**, *32* (3–4), 243–259.
- (26) Babic, M.; Hujer, A. M.; Bonomo, R. A. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. *Drug Resist. Updates* **2006**, *9* (3), 142–156.
- (27) Bass, L.; Liebert, C. A.; Lee, M. D.; Summers, A. O.; White, D. G.; Thayer, S. G.; Maurer, J. J. Incidence and characterization of integrons, genetic elements mediating multiple-drug resistance, in avian *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43* (12), 2925–2929.
- (28) Mazel, D.; Dychinco, B.; Webb, V. A.; Davies, J. Antibiotic resistance in the ECOR collection: Integrons and identification of a novel *aad* gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44* (6), 1568–1574.
- (29) Luczkiewicz, A.; Jankowska, K.; Fudala-Ksiazek, S.; Olanczuk-Neyman, K. Antimicrobial resistance of fecal indicators in municipal wastewater treatment plant. *Water Res.* **2010**, *44*, 5089–5097.
- (30) Gros, M.; Petrovic, M.; Barcelo, D. Tracing pharmaceutical residues of different therapeutic classes in environmental waters by using liquid chromatography/quadrupole-linear ion trap mass spectrometry and automated library searching. *Anal. Chem.* **2008**, *81* (3), 898–912.
- (31) Focazio, M. J.; Kolpin, D. W.; Barnes, K. K.; Furlong, E. T.; Meyer, M. T.; Zaugg, S. D.; Barber, L. B.; Thurman, M. E. A national reconnaissance for pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States—II) untreated drinking water sources. *Sci. Total Environ.* **2008**, *402* (2–3), 201–216.
- (32) Tuc Dinh, Q.; Alliot, F.; Moreau-Guigon, E.; Eurin, J.; Chevreuil, M.; Labadie, P. Measurement of trace levels of antibiotics in river water using on-line enrichment and triple-quadrupole LC-MS/MS. *Talanta* **2011**, *85* (3), 1238–1245.
- (33) Längin, A.; Alexy, R.; König, A.; Kümmerer, K. Deactivation and transformation products in biodegradability testing of β -lactams amoxicillin and piperacillin. *Chemosphere* **2009**, *75* (3), 347–354.
- (34) Roe, M. T.; Vega, E.; Pillai, S. D. Antimicrobial resistance markers of class 1 and class 2 integron-bearing *Escherichia coli* from irrigation water and sediments. *Emerging Infect. Dis.* **2003**, *9* (7), 822–826.
- (35) Sáenz, Y.; Vinué, L.; Ruiz, E.; Somalo, S.; Martinez, S.; Rojo-Bezares, B.; Zarazaga, M.; Torres, C. Class 1 integrons lacking *qacEΔ1* and *su1* genes in *Escherichia coli* isolates of food, animal and human origins. *Vet. Microbiol.* **2010**, *144* (3–4), 493–497.
- (36) White, P. A.; McIver, C. J.; Rawlinson, W. D. Integrons and gene cassettes in the *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45* (9), 2658–2661.
- (37) Roberts, M. C. Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiol. Lett.* **2005**, *245* (2), 195–203.
- (38) Skulason, S.; Ingolfsson, E.; Kristmundsdottir, T. Development of a simple HPLC method for separation of doxycycline and its degradation products. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2003**, *33* (4), 667–672.
- (39) Kim, S.; Eichhorn, P.; Jensen, J. N.; Weber, A. S.; Aga, D. S. Removal of antibiotics in wastewater: Effect of hydraulic and solid retention times on the fate of tetracycline in the activated sludge process. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39* (15), 5816–5823.
- (40) Andreozzi, R.; Caprio, V.; Ciniglia, C.; de Champdoré, M.; Giudice, R. L.; Marotta, R.; Zuccato, E. Antibiotics in the environment: Occurrence in Italian STPs, fate, and preliminary assessment on algal toxicity of amoxicillin. *Environ. Sci. Technol.* **2004**, *38* (24), 6832–6838.
- (41) Laroche, E.; Pawlak, B.; Berthe, T.; Skurnik, D.; Petit, F. Occurrence of antibiotic resistance and class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli* isolated from a densely populated estuary (Seine, France). *FEMS Microbiol. Ecol.* **2009**, *68* (1), 118–130.
- (42) Koczura, R.; Mockracka, J.; Jablonska, L.; Gozdecka, E.; Kubeł, M.; Kaznowski, A. Antimicrobial resistance of integron-harboring *Escherichia coli* isolates from clinical samples, wastewater treatment plant and river water. *Sci. Total Environ.* **2011**, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2011.10.036.
- (43) Pei, R.; Kim, S. C.; Carlson, K. H.; Pruden, A. Effect of river landscape on the sediment concentrations of antibiotics and corresponding antibiotic resistance genes (ARG). *Water Res.* **2006**, *40* (12), 2427–2435.
- (44) Pruden, A.; Pei, R.; Storteboom, H.; Carlson, K. H. Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: Studies in northern Colorado. *Environ. Sci. Technol.* **2006**, *40* (23), 7445–7450.

Article 2 :

“Changes in Enterococcal Populations and Related Antibiotic Resistance Along a Medical Center-Wastewater Treatment Plant-River Continuum”

Roland Leclercq, **Kenny Oberlé**, Sébastien Galopin, Vincent Cattoir, Hélène Budzinski and Fabienne Petit

Publié dans Applied and Environmental Microbiology, 2013, volume 79, pp. 2428 – 2434

Changes in Enterococcal Populations and Related Antibiotic Resistance Along a Medical Center-Wastewater Treatment Plant-River Continuum

Roland Leclercq^{a, #}, Kenny Oberlé^{b, c, d}, Sébastien Galopin^a, Vincent Cattoir^a, Hélène Budzinski^c and Fabienne Petit^{b, c, d}

^a Université de Caen Basse-Normandie, EA4655, CHU de Caen, 14000 Caen, France

^b Université de Rouen, UMR 6143 M2C, 76821 Mont-Saint-Aignan Cedex, France

^c CNRS, UMR 6143 M2C, 76821 Mont-Saint-Aignan Cedex, France

^d Université de Rouen, SFR SCALE, 76821 Mont-Saint-Aignan Cedex, France

^e Université Bordeaux1, UMR CNRS 5805 EPOC-LPTC1, 33405 Talence cedex, France

Running Title : Enterococci in a medical center-WWTP-river continuum

Correspondent footnote : Mailing address: Department of Microbiology, CHU de Caen, avenue Côte de Nacre, 14033 Caen cedex, France. Phone: (+33) 231 06 45 72 ; Fax: (+33) 231 06 45 73. E-mail: leclercq-r@chu-caen.fr

ABSTRACT

To determine if hospital effluent input has an ecological impact on downstream aquatic environment, antibiotic resistance in *Enterococcus* spp. along a medical center-retirement home-wastewater treatment plant-river continuum in France was determined using a culture-based method. Data on antibiotic consumption among hospitalized and general populations and levels of water contamination by antibiotics were collected. All isolated enterococci were genotypically identified to the species level, tested for *in vitro* antibiotic susceptibility, and typed by multilocus sequence typing. The *erm*(B) and *mef*(A) (macrolide resistance) and *tet*(M) (tetracycline resistance) genes were detected by PCR. All along the continuum, from 89 to 98% of enterococci, according to the sampled site, were identified as *Enterococcus faecium*. All *E. faecium* isolates from hospital and retirement home effluents were multiply resistant to antibiotics, contained *erm*(B) and *mef*(A) genes, and belonged to the hospital-adapted clonal complex 17 (CC17). Even though this species remained dominant in the downstream continuum, the relative proportion of CC17 isolates progressively decreased in favor of other subpopulations of *E. faecium*, more diverse, less resistant to antibiotics, devoid of the classical macrolide-resistance genes, and belonging to various sequence types. Antibiotic concentrations in waters were far below the MICs for susceptible isolates. CC17 *E. faecium* were probably acquired in the gastro-intestinal tract of patients under the selective pressure of administered antibiotics and then excreted together with the resistance genes in waters to progressively decrease along the continuum.

INTRODUCTION

Enterococci are gram-positive, opportunistic bacteria that inhabit the gastrointestinal tracts of humans and many animals. They are also widely present as fecal contaminants of food and as starter cultures for the production of cheese and fermented sausages. In humans, *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*, are among the major causes of nosocomial infections worldwide. They are increasingly isolated from the bloodstream, urinary tract, and surgical sites. Although *E. faecalis* remains the predominant species, the proportion of *E. faecium* in clinical isolates has markedly increased (1). A reason for the increasing frequency of *E. faecium* as a cause of various infections could be its propensity for acquisition of antibiotic resistance genes. In particular, the prevalence of vancomycin-resistant enterococci (VRE) has been on the rise in the last decades. The antimicrobial pressure in a hospital environment would be the driving force for its selection. It is now considered that a distinct subpopulation consisting of hospital-adapted, ampicillin-resistant *E. faecium* strains has been a key factor for successful spread of multiply antibiotic resistant *E. faecium* (resistant or not to vancomycin) in hospitals. Molecular epidemiological surveys using DNA sequence typing (multilocus sequence typing – MLST) and phylogenetic analysis have shown that this subpopulation belongs to a limited number of sequence-types (ST) that could be grouped in a clonal complex, designated as CC17 (2, 3). Clones belonging to the CC17 lineage are mostly characterized by ampicillin and fluoroquinolone resistance (4) and possess a pathogenicity island harboring putative virulence genes *esp* and *hyl_{Efm}* coding for an enterococcal surface protein and a hyaluronidase, respectively (5).

Massive antibiotic use in human and veterinary medicines taken as a whole is considered as the cause of the emergence of bacterial resistance regarded as a major problem for public health on a world-wide scale. In Europe, about 10,000 tons of antibiotics are consumed per

year (6), equally for veterinary usage (growth promotion up to 2006, prophylaxis and treatment) and in human medicine. After antibiotic consumption, a large proportion of the administered antibiotics are excreted into the environment via urine and feces in metabolized and non-metabolized forms or coupled with polar molecules (7). Thus, these antibiotic residues that contaminate aquatic environments (8) may play a role in selection of antibiotic-resistant bacteria. However, this is a controversial issue in part because the ecology of bacteria and their resistance genes in the agricultural and urban environment is poorly documented.

In addition to putative selection pressure related to the input of antibiotics and their degradation products in waters, antibiotic-resistant faecal bacteria selected in humans and animals and released in effluents may also contaminate aquatic environments (9). In developed countries, the most important sources of antibiotic-resistant faecal bacteria are effluents of wastewater treatment plants (WWTP) (10). The second well-known contribution of antibiotic-resistant faecal bacteria is due to both soil leaching and run-offs, for which the quantities and the frequencies depend on the hydrology and the use of the watershed (11). Once released in environmental water, survival of enterococci depends on biotic and abiotic factors mainly their ability to overcome environmental stresses (oligotrophy, sunlight, salinity), the viral lysis, and protozoan predation. Moreover, persistence of enterococci in water is greatly influenced by their association to organic matter, such as biofilms on copepods or plankton (12, 13). However, little is currently known about the evolution of the contamination by both antibiotic compounds and antibiotic-resistant bacteria in aquatic environments from the source of contamination to the river.

Recently, a multidisciplinary study associating chemists, hydrologists, and microbiologists was launched to investigate the relationship between the presence of antibiotics and that of

antibiotic-resistant *E. coli* in waters along a medical center – WWTP – river continuum (4 km) during a period of flu outbreak leading to increased antibiotic prescription by general practitioners (14). In this study, we used the same sampling datasets to obtain a deeper understanding of the changes of enterococcal populations and of their resistance to antibiotics along this continuum.

MATERIALS AND METHODS

Study sites and sampling strategy. Contamination by antibiotics and by the antibiotic-resistant enterococci was investigated along a continuum formed by a medical center, a retirement home, a WWTP and a river in the North-West of France (Fig. 1). During a high epidemic period corresponding to maximal antibiotic use (flu outbreak, December 2009), samples were collected along the pathway from medical center effluents to a river (Table 1) using autosamplers (ISCO 6700s, Roucaire, Courtaboeuf, France). One sample was collected from each site. Effluent samples from the hospital (sampling site No. 1) and the retirement home (sampling site No. 2) were collected at two discharge points before the main sewer. Another site, located 4 Km away from the medical center, was the town's wastewater treatment plant (WWTP), which collects the wastewaters of the medical center and of 9,058 inhabitants. The WWTP treatment consisted in a primary treatment with a screen, an aerated grit-removal tank, and a primary clarifier. The secondary treatment was an activated sludge system and a second clarifier. Mean daily wastewater samples were collected at the entrance (sampling site No. 3) and the outlet (sampling site No. 4) of the WWTP. Sampling site No. 5, located 4.1 Km away from the medical center, was the WWTP discharge in the river (located at 4 meters from the WWTP outlet). Finally, the upstream of the river (sampling site No. 6) before the discharge of the WWTP was sampled independently. All the samples were collected as follows: hospital wastewaters (1 liter every hour for 24h), retirement home

wastewaters (1 liter every hour for 21h), WWTP influent and effluent (1 liter every hour for 24h), the discharge of the WWTP in the river (1 liter every hour for 16h) and the upstream of the river (1 liter every hour for 24h). After the collection of 1 liter every hour, 250 mL from each sample flask (24 flasks of 1 liter) were pooled for analysis. Samples were collected in polyethylene flasks for microbiological analyses and in 4 glass and 2 amber glass flasks for chemical analyses. Samples were stored at 4 – 6°C and microbiological analysis was carried out within 8 hours. For chemical analysis, samples were first filtered and then frozen at -20°C until analysis was performed.

Detection and quantification of antibiotics in water samples. The chemical analysis, using Solid Phase Extraction (SPE) coupled with Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry (LC-MS-MS) as previously described (14), was performed to determine levels of contamination by 34 antibiotics and relationship with antibiotic use. Chosen antibiotics were: 7 penicillins, 5 cephalosporins, 6 fluoroquinolones, 2 quinolones, 4 tetracyclines, 10 sulfonamides, a dihydrofolate reductase inhibitor (trimethoprim), and 5 macrolides (14). The antibiotic consumption data were obtained from pharmacists both in the hospital and in the community (6 pharmacies) (14).

Isolation of enterococci. Enterococci were counted using membrane filtration methods (0.45 µm HA047 Millipore, Bedford, MA, USA). Filters were placed on a selective chromogenic agar specific for enterococci (Rapid'Enterococcus, Biorad, Marnes-la-Coquette, France) and incubated for 48 h at 44°C. Blue colonies were then isolated on a Slanetz medium incubated for 48 h at 44°C. The threshold value for counting in water was 10 CFU per 100 ml. A maximum of 50 colonies randomly selected were studied for each sample site. Enterococcal isolates were stored at -80°C for further studies. A total of 240 enterococci isolated along the hospital continuum were thus collected.

Identification of enterococci and antibiotic susceptibility testing. Identification of enterococci was performed as follows. Enterococci were identified by using API Strept galleries (bioMérieux, La-Balme-les-Grottes, France). Identification of *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, and *E. casseliflavus* was confirmed by a multiplex PCR using primers specific for the *ddl* genes (encoding a bacterial ligase) of these species, as previously described (15).

For the other enterococcal species that yielded negative PCR results, in particular *Enterococcus hirae*, *Enterococcus durans*, and *Enterococcus avium*, a DNA fragment internal to the *sodA* gene was amplified and sequenced, as previously described (16).

Susceptibility of enterococci to antibiotics was tested by the agar diffusion method according to the recommendations of the Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) (<http://www.sfm-microbiologie.org>). The antibiotic disks and Mueller-Hinton medium were from BioRad and the tested antibiotics were: ampicillin, chloramphenicol, ciprofloxacin, erythromycin, gentamicin, kanamycin, lincomycin, linezolid, rifampin, streptomycin, tetracycline, and vancomycin. Bacteria were classified as susceptible, intermediate, or resistant according to the CA-SFM recommendations. *E. faecalis* CIP103214 (ATCC29212) was used as a quality control strain.

PCR of resistance genes. Isolates resistant to antimicrobials were tested for the presence of resistance genes by PCR. Specific oligonucleotide primers previously described were used to amplify the major resistance genes of resistance to macrolides and tetracyclines usually detected in clinical isolates of enterococci (17, 18). The *erm(B)* gene (encoding a ribosomal methylase) and the *mef(A)* gene (encoding an efflux pump belonging to the Major Facilitator Superfamily, MFS) conferring resistance to macrolides, and the *tet(M)* gene conferring resistance to tetracyclines were amplified. The strains of *Streptococcus pneumoniae* HM30 [*erm(B)*, *tet(M)*] and *S. pneumoniae* [*mef(A)*] were used as PCR positive controls. PCR conditions were as previously described (17, 19).

MultiLocus Sequence Typing. MLST assays based on polymorphism of seven housekeeping genes (*atpA*, *ddl*, *gdh*, *purK*, *gyd*, *pstS*, and *adk*) were performed as previously described (2). Different sequences were assigned allele numbers and different allelic profiles were assigned sequence types (STs) based on the *E. faecium* MLST database (<http://efaecium.mlst.net>). The e-burst software was used to define clonal complexes (20).

Statistical analysis. The percentages of enterococci resistant to ampicillin and those carrying the *erm(B)* or *mef(A)* genes in the water samples were compared using the Fisher's exact test. Tests were carried out using the GraphPad software (GraphPad, San Diego, CA). $P \leq 0.05$ was considered as statistically significant.

RESULTS

Water contamination by enterococci. Water contamination by enterococci was investigated along the hospital – retirement home – WWTP – river continuum (Fig. 1). Abundance of *Enterococcus* along the continuum decreased from $6.5 \cdot 10^6$ CFU.100 mL⁻¹ in the hospital effluent to $3.7 \cdot 10^2$ CFU.100mL⁻¹ in the WWTP plume (river), with flows of 1 m³.h⁻¹ (hospital effluents) to 23,6 m³.s⁻¹ (river) (Table 1). The species diversity was low and *E. faecium* was largely predominant throughout the continuum (Table 1), with a few isolates of *E. faecalis*, *Enterococcus durans*, and *Enterococcus hirae*.

Resistance to antibiotics in enterococci. Along the continuum, no isolate was resistant to vancomycin or to linezolid. One hundred % and 87.5% of isolates (all enterococcal species combined) were resistant to penicillins in hospital and retirement home effluents, respectively (Table 2). By contrast, only 19.1% and 19% isolates from WWTP inflow and effluent were resistant to ampicillin, respectively ($P < 0.0001$). Finally, in the receiving river (sampled site No. 5), the frequency of resistance to ampicillin was only 4% ($P < 0.0001$ compared to hospital and retirement home; $P = 0.012$ compared to WWTP).

Similarly, high level resistance to fluoroquinolones, defined by growth at the contact of the ciprofloxacin disk by the disk-diffusion method was detected in 100% and 75% of enterococcal isolates from retirement home and hospital effluents, respectively, and 15.6%, 17%, and 5% from WWTP inflow, WWTP effluents, and river, respectively. No isolate from hospital effluents was resistant to tetracyclines, whereas a small proportion of resistant isolates was detected in the effluents of the retirement home (21%), WWTP (influent 28%, effluent 26%) and in the river (24%). Proportion of isolates non susceptible to erythromycin exceeded 70% throughout the continuum (Table 2). However, differences in the levels of resistance to erythromycin were observed, depending on the sampled site. All non-susceptible isolates from the hospital and retirement home effluents displayed high level resistance to erythromycin (defined by growth at the contact of erythromycin disk) whereas most from WWTP effluents and river were intermediately resistant to erythromycin. The changes in multiple resistance to antibiotics (resistance to high levels of ampicillin, fluoroquinolones, and erythromycin) were mostly observed in the *E. faecium* isolates that were predominant throughout the continuum, suggesting corresponding variations in sub-populations of *E. faecium*.

Macrolide and tetracycline resistance genes in enterococci. Since *E. faecium* was the majority species, all subsequent studies were done on isolates belonging to this species. The mechanisms explaining the resistance displayed by the great majority of *E. faecium* differed according to the sampled site (Table 3). Detection by PCR of the antibiotic resistance gene content of isolates showed that the *erm*(B) gene was present in more than 75% of isolates in hospital and retirement home effluents. The prevalence of this gene decreased along the continuum to reach only 6.7% of isolates from the river. The efflux gene *mef*(A), alone or combined, was more prevalent in the WWTP (43.8% in influent and 57.9% in effluent) than in the hospital and retirement home effluents (25% and 4.8%, respectively).

Obviously, other mechanisms of resistance than ribosomal methylation by an Erm(B) methylase or efflux by a Mef(A) pump were responsible for resistance to macrolides in the majority of isolates from WWTP effluents and river.

Resistance to tetracyclines was mostly explained by the presence of the *tet(M)* gene present in 100% of tetracycline-resistant isolates of retirement home effluents, 92.3% and 83% of WWTP influent and effluent isolates, respectively, and 86.7% of river isolates. Few *E. faecium* isolates were resistant to high levels of gentamicin (hospital effluents, n=5; WWTP influent, n=3; WWTP effluent, n=2; river, n=1), except in the retirement home (n=10).

Sequence types. Twelve to 15 *E. faecium* isolates per site were studied by MLST (Table 4). All isolates from the hospital and retirement home effluents belonged to the ST78 that is part of the clonal complex CC17, typically including hospital-adapted and outbreak-associated isolates. The presence of ST78 or of other STs belonging to the CC17 complex was also detected in the downstream continuum but the isolates were in minority. By contrast, *E. faecium* isolates from the downstream continuum belonged to various STs, including some that have never been reported before. The greater diversity was observed in the river. Some STs of isolates from WWTP and river were grouped in sequence-types that were previously characterized by phylogenetic analysis as associated to poultry and pigs (ST266, ST29, and ST178) (3).

Antibiotic consumption and contamination of water by antibiotics. Antimicrobial consumption data have been presented in details elsewhere, except those for macrolides, presented herein for hospital and retirement home and can be summarized as follows (14, Table 5). During the study period, three antibiotic families were mostly prescribed at the hospital: β -lactams (penicillins and cephalosporins), quinolones, and macrolides. In addition, a few sulphonamides and tetracyclines were also prescribed. At retirement home, β -lactams,

quinolones, and, at a lesser extent, macrolides were prescribed. The most prescribed antibiotic family (penicillins) was detected in effluents at low concentrations, which can be explained by an important degradation of penicillins in water, essentially by hydrolysis (21). By contrast, quinolones, cephalosporins, and macrolides, less prescribed but more stable, were detected at relatively high concentrations, respectively 141 ng/ml, 161 ng/ml, and 7.5 ng/ml in hospital effluents (Table 3). Of note, although not or poorly prescribed, tetracyclines and sulfonamides were detected in hospital effluents and in retirement home effluents, respectively. The presence of these molecules could be explained by uncontrolled inputs such as those from staff members (100 persons per day) and/or visitors.

DISCUSSION

Enterococci and *E. coli* are used as fecal indicator bacteria, reflecting the human health risk in drinking and recreational waters (22). In this study, the fate of enterococci resistant to antibiotics in relation to the presence of antibiotics in water was monitored from a medical center to a river.

E. faecium was largely dominant throughout the continuum as the dominant species. The under-representation of the other species, in particular *E. faecalis*, was unexpected. However, sampling of the river (site No. 6, Fig.1) upstream from the human continuum using the same methodology showed, as expected, a greater biodiversity and a predominance of *E. faecalis*, with 50% of *E. faecalis*, 20% of *E. faecium*, 14% of *E. casseliflavus*, 7% of *E. durans*, and 2% of *E. avium* (data not shown). Therefore, the predominance of *E. faecium* appeared to be particular to this continuum. However, since sampling was performed only in December, we cannot rule out the influence of seasonal variations not only on the amounts of enterococci in water but also on the relative proportion of the various enterococcal species

(23). In a recent study, persistence of enterococci in winter months in water was dependent upon the bacterial species (24). In particular, *E. hirae* was able to replicate in the environment at a high rate even in winter. However, this species was not prevalent in our study. The predominance of *E. faecium* was related to human activity in certain studies. In Canadian surveys, it has been shown that *E. faecalis* was dominant in waters of agricultural areas and in domesticated mammals and birds, and wildlife feces, whereas *E. faecium* was dominant among wastewater isolates (25, 26). In a municipal WWTP from Poland, *E. faecium* was also predominant (60.8% of enterococci) (27). Finally, in a recent study, *E. faecium* represented the vast majority of enterococci that were detected in the sediments of the lake of Geneva (Switzerland) that is subjected to extensive microbial contamination by WWTP outlet discharges and rivers (28).

In our study, *E. faecium* from the effluents of hospital and retirement home were highly resistant to penicillins, cephalosporins (intrinsic resistance), and fluoroquinolones. Factors that might lead to selection of particular groups of antibiotic-resistant enterococci in environment are i/ antibiotic consumption by humans and animals that results in excretion of resistant bacteria mostly by feces and ii/ the presence of antibiotics in water that can create or maintain the selective pressure. The concentration of fluoroquinolones (0.14 ng/ml) and cephalosporins (0.16 ng/ml) in hospital effluents was far below the MICs for susceptible enterococci [MIC greater than 16 µg/ml for cephalosporins and equal to 1 or 2 µg/ml for ciprofloxacin, the most active fluoroquinolone (29)] and much more below those for resistant enterococci. However, it has been postulated that sub-MICs may have selective effects leading to enrichment of environment by antibiotic-resistant bacteria (30, 31). In a recent publication, minimum selective concentrations for resistant *E. coli* and *Salmonella* spp. were 100 pg/ml and 15 ng/ml, for ciprofloxacin and tetracycline, respectively (32). These concentration levels were detected in the hospital and retirement home effluents and may have

contributed to select resistant strains. By contrast, in the downstream effluents, antibiotic concentrations were very low and contribution of the free antibiotic concentrations in water to maintain a selective pressure against the multiply resistant enterococci was unlikely. However, we cannot exclude the presence of higher concentrations of antibiotics associated with sediments or particles in waters as previously reported for quinolones marine sediments (33). Most likely, antibiotic-resistant bacteria have been selected in the gut of patients by these antibiotics highly prescribed in these healthcare settings. The resistant bacteria would then have been excreted in effluents. However, no screening of hospitalized patients' stools has been carried out to confirm this hypothesis and no *E. faecium* outbreak has been notified by the hospital. The typing of all *E. faecium* isolates from hospital and retirement as ST78, a typical sequence-type of the complex CC17 associated with hospital outbreaks, supports this hypothesis. The reason for the high frequency of high-level resistance to gentamicin in enterococci from retirement home as compared to low frequency in isolates from the other sampled sites, including hospital, remained unknown. Although aminoglycosides were rarely prescribed in the retirement home (data not shown), resistance of isolates to high levels of gentamicin might have been co-selected by β -lactams or fluoroquinolones and then spread. Although *E. faecium* isolates were multiply resistant to antibiotics, none was resistant to vancomycin. This might be related to a low prevalence of resistance to vancomycin in France (34, EARSS web site; http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-Net/database/Pages/map_reports.aspx), in contrast to other European countries and the USA (35). Recently, in Ireland where the prevalence of resistance to vancomycin in clinical isolates of *E. faecium* reaches 44%, VRE were detected in the outflow of a wastewater treatment plant and in a single rural drinking water supply (36). A similar observation was reported in wastewaters from the south coast of England (37) and in Portugal (38), two countries with high prevalence of VRE.

Our study showed that there was no significant differences in the proportions of *E. faecium* between the inflow and the effluent from WWTP and therefore that wastewater treatment did not result in a specific removal of *E. faecium*. The same observation has been done previously for VRE (38, 39). However, it should be noted that the WWTP inflow contained a decreased proportion of CC17 *E. faecium* as compared to medical center effluents, in relation either to a poor survival of CC17 isolates in water or more likely to dilution by other types of *E. faecium*. A greater diversity of *E. faecium* STs was observed and only few isolates were resistant to ampicillin and fluoroquinolones. Except for CC17 isolates, no link based on clonal groups to a particular host could be found.

Downstream, in the river, a greater diversity of enterococcal species and of *E. faecium* STs was noted. Some *E. faecium* isolates displayed STs belonging to clonal complexes associated with pig isolates (3). The percentages of resistance to ampicillin and to high levels of ciprofloxacin continued to decrease, although not significantly as compared to WWTP. However, CC17 *E. faecium* isolates still persisted in the WWTP plume, but at very low counts. Again, a dilution effect likely contributed to the relative disappearance of the multiply resistant isolates. It should be noted that although the percentage of resistance to macrolides remained high throughout the continuum (Table 3), the level of resistance progressively decreased from high to intermediate.

The persistence in waters of bacteria with mobile resistance genes presents a hazard for transfer of resistance genes to pathogenic bacteria and further dissemination. Resistance to ampicillin and to fluoroquinolones in enterococci is considered as non transferable since it is commonly related to mutations in chromosomal genes, namely the *pbp5* gene and the *gyrA* and *parC* genes, respectively. By contrast, resistance to macrolides and tetracyclines in enterococci from humans and animals is often borne by mobile genetic elements bearing the *erm(B)* and *tet(M)* genes, respectively (18, 39) and may be acquired by other Gram-positive

pathogens. Beyond the snapshot provided by the study of antibiotic-resistance genes at a given moment in specific reservoirs, the occurrence and the fate of the antibiotic-resistance genes flux in nature should be monitored, which is currently difficult to perform. In hospital and retirement home effluents, high-level resistance to erythromycin is mostly explained by the presence of the classical *erm*(B) gene alone or combined with the efflux *mef*(A) gene. These genes are shared by other Gram-positive human pathogens, such as *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* (40). In the rest of the continuum, the prevalence of these genes decreased together with the prevalence of ampicillin-, ciprofloxacin-resistant isolates. In the WWTP plume, these genes rarely accounted for resistance to erythromycin, still expressed by a majority of isolates. The other mechanisms responsible for resistance to erythromycin were not investigated in this study.

Our data are consistent with those obtained previously for *E. coli* in the same continuum at the same period (14). Antibiotic-resistant *E. coli* were detected in medical centers effluents that originated from patients. Along the continuum, the occurrence of *E. coli* resistant to antibiotics and those carrying class 1 integrons significantly decreased in water samples.

In conclusion, we have observed in hospital and retirement home effluents the presence of ampicillin-, ciprofloxacin-resistant enterococci bearing acquired macrolide resistance genes with an overwhelming representation of *E. faecium* belonging to the CC17 complex. These bacteria would have been acquired in the gastro-intestinal tract of patients under the selective pressure of administered antibiotics and then excreted together with the resistance genes in waters where they may be initially maintained by low antibiotic levels. Although the species *E. faecium* remained dominant in the downstream continuum, the proportion of CC17 spontaneously started to decrease before passage through the WWTP in favor of other subpopulations of *E. faecium* more diverse, less resistant to antibiotics, devoid

of the classical macrolides-resistance genes, and belonging to various STs. Their original host could not be identified in most cases, although some isolates came probably from animal reservoirs, pigs and poultry. Although free antibiotics were detected in downstream waters, their barely detectable levels would unlikely allow selection of resistant enterococci.

Acknowledgments

This work was supported by the scientific program FLASH-Seine Aval (<http://seine-aval.crihan.fr/web/>), EC2CO CNRS, and by grant of Ministry of Research to EA4655. KO held a research grant (SFR SCALE) from Haute Normandie regional council (France).

We thank Michel Simon, Caroline Bance and Michel Auzou for excellent technical assistance. We thank also Michel Leroux, Aurélie Lamy, Yvon Goarvot, Sophie Coté, and downtown pharmacists for antibiotic consumption data, and the people that let us access to the medical center and to the WWTP.

References

1. **Arias CA, Murray BE.** The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. 2012. Nat. Rev. Microbiol. **10**:266-278.

2. **Homan WL, Tribe D, Poznanski S, Li M, Hogg G, Spalburg E, Van Embden JD, Willems RJ.** 2002. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecium*. J. Clin. Microbiol. **40**:1963-1971.

3. **Willems RJ, Top J, van Santen M, Robinson DA, Coque TM, Baquero F, Grundmann H, Bonten MJ.** 2005. Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex. Emerg. Infect. Dis. **11**:821-828.

4. **Top J, Willems R, Bonten M.** 2008. Emergence of CC17 *Enterococcus faecium*: from commensal to hospital-adapted pathogen. FEMS Immunol. Med. Microbiol. **52**:297-308.

5. **van Schaik W, Top J, Riley DR, Boekhorst J, Vrijenhoek JE, Schapendonk CM, Hendrickx AP, Nijman IJ, Bonten MJ, Tettelin H, Willems RJ.** 2010. Pyrosequencing-based comparative genome analysis of the nosocomial pathogen *Enterococcus faecium* and identification of a large transferable pathogenicity island. BMC Genomics. **11**:239.

6. **Kümmerer K.** 2003. Significance of antibiotics in the environment. J. Antimicrob. Chemother. **52**:5-7.

7. **Chambers H.F.** 2001. Antimicrobial agents: protein synthesis inhibitors and miscellaneous antibacterial agents, p 1239-1271. In: Brunton LL, Chabner BA, Knollmann BC (ed),

Goodman and Gilman's The Pharmacological basis of therapeutics; New-York: McGraw-Hill.

8. **Zuccato E, Castiglioni S, Bagnati R, Melis M, Fanelli R.** 2010. Source, occurrence and fate of antibiotics in the Italian aquatic environment. *J. Hazard Mater.* **179**:1042-1048.

9. **Salyers AA, Gupta A, Wang Y.** 2004. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. *Trends Microbiol.* **12**:412-416.

10. **Reinthal FF, Posch J, Feierl G, Wüst G, Haas D, Ruckebauer G, Mascher F, Marth E.** 2003. Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge. *Water Res.* **37**:1685-1690.

11. **Cristian T, Schneider RJ, Fäber H, Skutlarek D, Meyer MT, Goldbach HE.** 2003. Determination of antibiotic residues in manure, soil, and surface waters. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* **31**: 36-44.

12. **Mote BL, Turner JW, Lipp EK.** 2012. Persistence and growth of the fecal indicator bacteria enterococci in detritus and natural estuarine plankton communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**:2569-2577.

13. **Signoretto C, Burlacchini G, Pruzzo C, Canepari P.** 2005. Persistence of *Enterococcus faecalis* in aquatic environments via surface interactions with copepods. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 2756–2761.

14. **Oberlé K, Capdeville MJ, Berthe T, Budzinski H, Petit F.** 2012. Evidence for a complex relationship between antibiotics and antibiotic-resistant *Escherichia coli*: from medical center patients to a receiving environment. *Environ. Sci. Technol.* **46**:1859-1868.

15. **Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P.** 1995. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J. Clin. Microbiol.* **33**:24-27.

16. **Poyart C, Quesnes G, Trieu-Cuot P.** 2000. Sequencing the gene encoding manganese-dependent superoxide dismutase for rapid species identification of enterococci. *J. Clin. Microbiol.* **38**:415-418.

17. **Angot P, Vergnaud M, Auzou M, Leclercq R.** 2000. Macrolide resistance phenotypes and genotypes in French clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Observatoire de Normandie du Pneumocoque. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **19**:755-758.

18. **Petsaris O, Mischczak F, Gicquel-Bruneau M, Perrin-Guyomard A, Humbert F, Sanders P, Leclercq R.** 2005. Combined antimicrobial resistance in *Enterococcus faecium* isolated from chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:2796-2799.

19. **Aminov RI, Garrigues-Jeanjean N, Mackie RI.** 2001. Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:22-32.

20. **Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, Hanage WP, Spratt BG.** 2004. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *J. Bacteriol.* **186**:1518-1530.

21. **Längin A, Alexy R, König A, Kümmerer K.** 2009. Deactivation and transformation products in biodegradability testing of beta-lactams amoxicillin and piperacillin. *Chemosphere* **75**:347-354.

22. **WHO 2004.** 2004. WHO Guidelines for Drinking-water Quality, p. 515. Recommendations, 3rd ed, vol. 1. World Health Organization, Geneva.

23. **Pan X, Jones KD.** 2012. Seasonal variation of fecal indicator bacteria in storm events within the US stormwater database. *Water Sci. Technol.* **65**:1076-1080.

24. **Bonjoch X, García-Aljaro C, Blanch AR.** 2011. Persistence and diversity of faecal coliform and enterococci populations in faecally polluted waters. *J. Appl. Microbiol.* **111**:209-215.

25. **Lanthier M, Scott A, Lapen DR, Zhang Y, Topp E.** 2010. Frequency of virulence genes and antibiotic resistances in *Enterococcus* spp. isolates from wastewater and feces of domesticated mammals and birds, and wildlife. *Can. J. Microbiol.* **56**:715-729.

26. **Lanthier M, Scott A, Zhang Y, Cloutier M, Durie D, Henderson VC, Wilkes G, Lapen DR, Topp E.** 2011. Distribution of selected virulence genes and antibiotic resistance

in *Enterococcus* species isolated from the South Nation River drainage basin, Ontario, Canada. J. Appl. Microbiol. **110**:407-421.

27. **Łuczkiewicz A, Jankowska K, Fudala-Książek S, Olańczuk-Neyman K.** 2010. Antimicrobial resistance of fecal indicators in municipal wastewater treatment plant. Water Res. **44**:5089-5097.

28. **Thevenon F, Regier N, Benagli C, Tonolla M, Adatte T, Wildi W, Poté J.** 2012. Characterization of fecal indicator bacteria in sediments cores from the largest freshwater lake of Western Europe (Lake Geneva, Switzerland). Ecotoxicol. Environ. Saf. **78**:50-56.

29. **Varon E.** Quinolones and Gram-positive bacteria, p. 243-259. In “Antibiogram” P. Courvalin, R. Leclercq, L. Rice (ed), ESKA Publishing ASM Press, Portland, USA.

30. **Liu A, Fong A, Becket E, Yuan J, Tamae C, Medrano L, Maiz M, Wahba C, Lee C, Lee K, Tran KP, Yang H, Hoffman RM, Salih A, Miller JH.** 2011. Selective advantage of resistant strains at trace levels of antibiotics: a simple and ultrasensitive color test for detection of antibiotics and genotoxic agents. Antimicrob. Agents Chemother. **55**:1204–1210.

31. **Baquero F, Negri MC, Morosini MI, Blazquez J.** 1998. Antibiotic-selective environments. Clin. Infect. Dis. **27**:S5–S11.

32. **Gullberg E, Cao S, Berg OG, Ilbäck C, Sandegren L, Hughes D, Andersson DI.** 2011. Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. PloS Pathog. **7**:e1002158.

33. **Xu WH, Zhang G, Wai OWH, Zou SC, Li XD.** 2009. Transport and adsorption of antibiotics by marine sediments in a dynamic environment. *J. Soils Sediments* **9**:364–373.
34. **Bourdon N, Fines-Guyon M, Thiolet JM, Maugat S, Coignard B, Leclercq R, Cattoir V.** 2011. Changing trends in vancomycin-resistant enterococci in French hospitals, 2001-08. *J. Antimicrob. Chemother.* **66**:713-721.
35. **Ramsey AM, Zilberberg MD.** 2009. Secular trends of hospitalization with vancomycin-resistant enterococcus infection in the United States, 2000-2006. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* **30**:184-186.
36. **Morris D, Galvin S, Boyle F, Hickey P, Mulligan M, Cormican M.** 2012. *Enterococcus faecium* of the *vanA* genotype in rural drinking water, effluent, and the aqueous environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**:596-598.
37. **Caplin JL, Hanlon GW, Taylor HD.** 2008. Presence of vancomycin and ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* of epidemic clonal complex-17 in wastewaters from the south coast of England. *Environ. Microbiol.* **10**:885–892.
38. **Araújo C, Torres C, Silva N, Carneiro C, Gonçalves A, Radhouani H, Correia S, da Costa PM, Paccheco R, Zarazaga M, Ruiz-Larrea F, Poeta P, Igrejas G.** 2010. Vancomycin-resistant enterococci from Portuguese wastewater treatment plants. *J. Basic Microbiol.* **50**:605-609.
39. **Hegstad K, Mikalsen T, Coque TM, Werner G, Sundsfjord A.** 2010. Mobile genetic elements and their contribution to the emergence of antimicrobial resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Clin. Microbiol. Infect.* **16**:541-554.

40. **Leclercq R.** 2002. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin. Infect. Dis.* **34**:482-492.

Figure 1. Sampled sites. The sampled sites are indicated by numbers. The water flow is shown by arrows. Dashed lines indicate pipes.

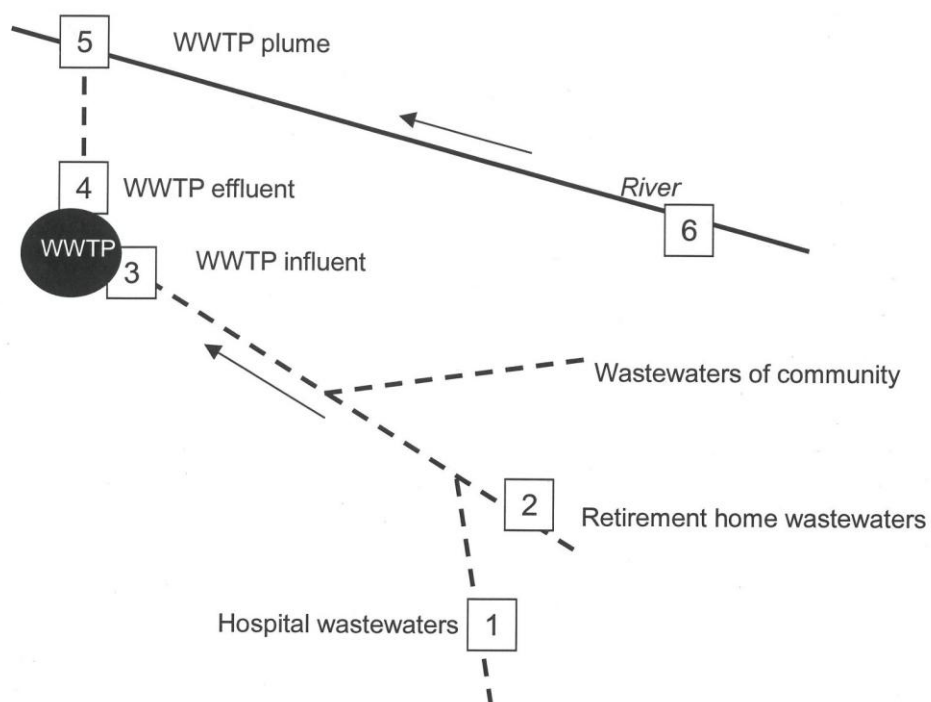


Table 1. Contamination of water by enterococci along the medical center - WWTP- river continuum.

	Retirement home ^a	Hospital ^b	WWTP		River
			Influent	Effluent	
	180 beds	87 beds	9,058 inhabitants		nr ^c
Anthropic pressure					
Density of enterococci					
(CFU. 100mL ⁻¹)	2.6 ± 1.6 x 10 ⁵	6.5 ± 0.1 x 10 ⁶	7.0 ± 0.4 x 10 ⁵	1.4 ± 0.2 x 10 ⁴	3.7 ± 1.0 x 10 ²
Number of tested enterococci	49	48	47	46	45
Proportion of <i>E. faecium</i> (%)	98	98	96	91	89
Proportion of <i>E. faecalis</i> (%)	0	2	0	0	0
Proportion of <i>E. durans</i> (%)	0	0	2	0	7
Proportion of <i>E. hirae</i> (%)	2	0	2	9	4

^a mean resident time 10 years; ^b mean resident time 4 to 28 days; ^c nr, not relevant

Table 2.Contamination of water by antibiotics and percentages of resistance to antibiotics in enterococci.

Antibiotic class	Sampled site									
	No. 1 Hospital		No. 2 Retirement home		No. 3 WWTP inflow		No. 4 WWTP effluent		No. 5 WWTP plume	
	Concentration (ng/ml)	% of resistant enterococci	Concentration (ng/ml)	% of resistant enterococci	Concentration (ng/ml)	% of resistant enterococci	Concentration (ng/ml)	% of resistant enterococci	Concentration (ng/ml)	% of resistant enterococci
Penicillins	0	100.0	0.7	87.5	0.0	19.1	0.0	19.0	0.0	4.0 ^{a,b}
Cephalosporins	161	- ^c	0.0	-	0.0	-	0.0	-	0.0	-
Fluoroquinolones	141	75.0	59	100.0	0.4	15.6	0.14	17.0	0.001	5.0
Tetracyclines	1	0.0	0	21.0	0.15	28.0	0.01	26.0	0.0	24.0
Macrolides	7.9	72.0	21.9	87.0	3.5	77.0	2.1	80.0	0.007	72.0

a : p-value<0.0001 compared to hospital and retirement home ; b : p-value = 0.012 compared to WWTP; c: -, antibiotic resistance not tested.

Table 3. Resistance to erythromycin and distribution of macrolides resistance genes according to the site.

Site	Percentage of isolates non susceptible to erythromycin ^a	Percentage of isolates with antibiotic resistance gene			
		<i>erm</i> (B)	<i>mef</i> (A)	<i>erm</i> (B) + <i>mef</i> (A)	Other
No. 1 Hospital	72	75	0	25	0
No. 2 Retirement home	87	85.7	4.8	0	9.5
No. 3 WWTP influent	77	12.5	18.8	25	43.7 ^b
No. 4 WWTP effluent	80	15.8	47.4	10.5	26.3 ^c
No. 5 WWTP Plume	72	6.7	6.7	0	86.7 ^d

^a Intermediate and resistant isolates

^b P<0.0001 vs hospital and retirement home.

^c P<0.0001 vs hospital; P=0.028 vs retirement home; P=0.053 vs WWTP influent

^d P<0.0001 vs hospital, retirement home, WWTP influent and effluent.

Table 4. Sequence-types of *E. faecium* isolates determined by MLST. Assignment to host reservoir was according to Willems (3).

Site (no of studied isolates)	Sequence-type (no of isolates)			
	Hospital-adapted (CC17 types)	Poultry- type	Human commensals, pig-type	Others
No. 1 Hospital (13)	ST78 (13)			
No. 2 Retirement home (15)	ST78 (15)			
No. 3 WWTP influent (14)	ST18 ST78			ST291, ST264, ST330,
No. 4 WWTP effluent (14)	ST78 (3), ST18		ST178	ST22, ST32 (3), ST new1, STnew2(2), STnew3
No. 5 WWTP plume (12)	ST78 ST402 ST165	ST266, ST29 (2),		ST22,ST32 (2), ST12, ST39, ST78,ST165, ST253, ST402, STnew4 (2)

Table 5. Antibiotic consumption

Antibiotic (g)	Hospital ^a	Retirement home ^a	Community ^b
Glycopeptide (vancomycin)	0	0	n.a. ^c
β-lactams			
Ampicillin/Amoxicillin	1930	544	258430
Cloxacillin	0	16	736
Cephalosporins	453	0	3444
Fluoroquinolones	115	0	980
Tetracyclines	1.1	0	1562
Macrolides	75	20	n.a

^a: antibiotic consumption one month before sampling^b: antibiotic consumption from October 2009 to March 2010^cn.a: not available

Chapitre 2 :

Devenir des antibiotiques et des populations d'*Escherichia coli* et d'*Enterococcus* spp. le long d'un continuum exploitation bovine –zone urbanisée

1. Contexte

A l'échelle d'un bassin versant, l'usage des sols par les hommes et les animaux est un facteur déterminant de la contamination microbiologique des eaux de surface [Mallin *et al.*, 2000 ; Didonato *et al.*, 2009 ; Lyautey *et al.*, 2010]. Des études menées sur la qualité des eaux douces et côtières ont montré que les densités en *Escherichia coli* et *Enterococcus* étaient directement liées à l'urbanisation, le nombre et la proximité des animaux d'élevage et l'ordre de la rivière [Mallin *et al.*, 2000 ; Lyautey *et al.*, 2010]. Des analyses de diversité des populations d'*E. coli* et *Enterococcus*, sur la base de méthodes d'empreintes moléculaires (rep-PCR, PFGE, ribotypage), de la composition en espèces et/ou de l'antibio-résistance, ont démontré l'impact de l'usage des sols sur l'abondance et la structure des populations circulantes dans les environnements aquatiques [Webster *et al.*, 2004 ; Ratajczak *et al.*, 2010 ; Lyautey *et al.*, 2010 ; Brownell *et al.*, 2007]. L'étude d'*E. coli* et d'*Enterococcus*, sur la base de l'indice de Shannon-Weiner, montre une plus grande diversité des populations lors d'un évènement pluvieux et une plus forte similarité en période sèche [Brownell *et al.*, 2007]. Cette étude montre que, en absence d'évènements de contaminants récents, les sous-populations d'*E. coli* et d'*Enterococcus* retrouvées dans les eaux seraient plus adaptées à cet environnement considéré alors comme leur habitat secondaire. Une étude sur quatre années à l'échelle d'un bassin versant canadien (3900 Km²) a montré qu'entre 3 à 6 génotypes, selon la méthodologie utilisée, sont dominants au sein de la population de 21 307 isolats d'*E. coli* [Lyautey *et al.*, 2010]. Ces génotypes correspondraient à des souches persistantes provenant des animaux d'élevage ou sauvages, et des hommes, principales sources de contamination de ces eaux. Dans cet environnement aquatique, la contamination en bactéries fécales antibio-résistantes est aussi fonction de la pression anthropique exercée sur le bassin versant. L'occurrence de souches d'*E. coli* résistantes aux antibiotiques sera plus élevée dans les eaux à l'aval d'un rejet ponctuel, impacté par des ruissellements et lessivages de sols pâturés lors d'évènements pluvieux, que dans les eaux d'un bassin versant forestier [Webster *et al.*, 2004 ; Ratajczak *et al.*, 2010].

2. Objectif

L'objectif de ce deuxième chapitre est d'étudier la contamination en résidus d'antibiotiques et le devenir des populations d'*E. coli* et d'*Enterococcus* en fonction d'un gradient de pression anthropique exercée sur un bassin versant le long d'un continuum

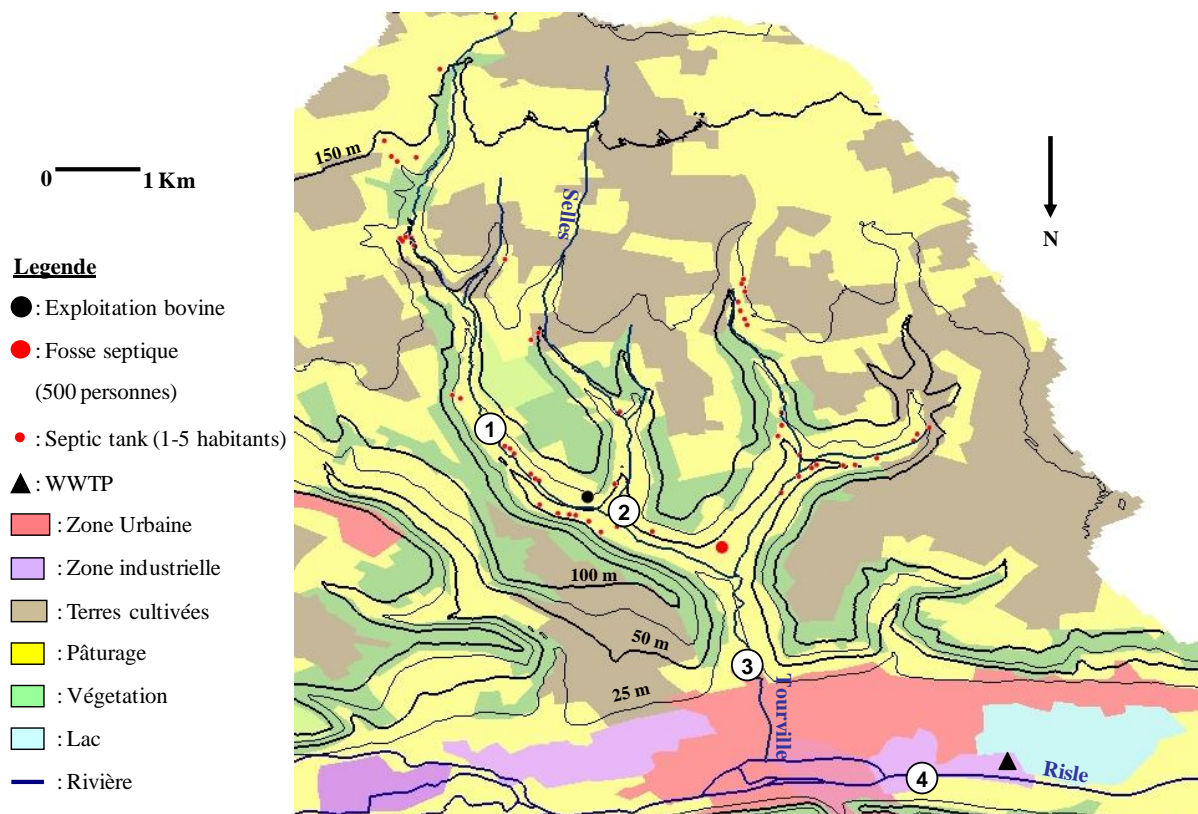


Figure 19: Cartographie de l'usage des sols et stratégie d'échantillonnage le long du bassin versant de la Tourville. Les sites échantillonnés sont numérotés de 1 à 4 d'amont en aval du bassin versant.

exploitation bovine – zone urbanisée, et pour des pratiques d'élevage contrastées : stabulation ou pâturage des bovins.

3. Démarche et stratégie expérimentale

3.1. Site d'étude et stratégie d'échantillonnage

Cette étude a été menée sur un réseau hydrographique de 10 Km composé de deux cours d'eau d'ordre de Strahler⁸ 2 (Sébec, Selles) qui alimentent le cours d'eau principal d'ordre de Strahler 3 (Tourville), lui-même affluent d'une rivière d'ordre de Strahler 4 (Risle), exutoire final du bassin versant (Figure 19). Ce bassin, d'une superficie de 52 Km² avec une pente de 1,45%, est soumis à un climat océanique : 674,8 mm de pluies cumulées par an et une pluviométrie de variant de 16,0 mm à 134,4 mm par mois. L'hydrosystème étudié se caractérise par un fort gradient de pression anthropique exercée sur son bassin versant le long d'un continuum exploitations bovines (200 ou 450 bovins / 278 ou 395 habitants) – zone urbanisée (9058 habitants / 57 bovins). L'amont du bassin versant est majoritairement composé de zones pâturées (47,8% de la surface totale), de terres cultivées pouvant être amendées par du fumier (38,0% de la surface totale) et des zones forestières (11,0% de la surface totale), alors que l'aval est dominé par une zone urbaine (3,2% de la surface totale) (Tableau 24). Le site amont n°1 (Sebec) est localisé dans une zone forestière à l'aval (4Km) d'une ferme qui exploite 200 bovins (ferme 1). A 2 Km en aval, le site n°2 (Selles) est à 50m d'une ferme avec un cheptel de 450 bovins (ferme 2). Le troisième site (Tourville, n°3), situé à 5 Km du site amont, collecte toutes les eaux du bassin versant. Ce site se localise à l'entrée de la zone urbaine et à proximité d'une structure scolaire (500 personnes) avec un assainissement non collectif défectueux, datant de 1954. Le dernier site en zone urbaine (Risle, n°4) est localisé à la confluence entre la Tourville et la Risle. Le long de ce continuum, la densité bovine évolue inversement à la densité humaine. En conséquence, à l'amont, les apports en bactéries fécales seront essentiellement dus aux ruissellements et lessivages des sols pâturés, ou des zones de dépôts du fumier en période de stabulation, qui s'additionnent à des apports de fosses septiques. L'efficacité du traitement des eaux usées évolue le long du continuum avec des fosses septiques exclusivement à l'amont et une station d'épuration à l'aval qui traite les effluents de la zone urbanisée, déjà étudiée dans le chapitre 1. Toutefois,

⁸ Classification qui attribue la valeur 1 à un cours d'eau qui ne possède pas d'affluent. Par la suite, un cours d'eau « n + 1 » est la résultante de la confluence de deux drains « n ».

Tableau 24: Contamination en *E. coli* et *Enterococcus* dans les eaux le long du continuum exploitation agricole – zone urbanisée.

Proxy environnementaux		Sebec		Selles		Tourville		Risle	
Type de bassin versant									
Taille (Km²)		16		8		51		2000	
Usage des sols		Pâturage / Forêt		Pâturage		Pâturage / Zone urbaine		Zone urbaine	
Ordre de la rivière		2		2		3		4	
Pression humaine									
Nombre d’habitants ¹		278		396		2284		11342	
Traitement des eaux usées ²	Non traité	0 ^a		16		21		65	
	Fosses septiques N (n)	92 ^a		159 (42)		168 (45)		97 (29)	
	STEP	0		0		0		945	
Animaux d’élevage									
Bovins ¹		200		450 +/- 10		4592		4649	
Proximité de la source de contamination		4000m		50m		> 500m		> 2000m	
Pratiques		Stabulation	Pâturage	Stabulation	Pâturage	Stabulation	Pâturage	Stabulation	Pâturage
Animaux sauvages									
Sanglier		++		+		+/-		-	
Chevreuil		+		+/-		-		-	
Conditions hydrologiques									
Pluviométrie ³ (mm)		27,2 ^b	18,2 ^c	27,2 ^b	18,2 ^c	27,2 ^b	18,2 ^c	27,2 ^b	18,2 ^c
Contamination fécale (CFU.100mL ⁻¹)									
Escherichia coli		1,1±0,1·10 ³	7,0±0,1·10 ²	1,9±0,6·10 ³	1,3±0,1·10 ³	2,8±0,1·10 ³	1,4±0,4·10 ³	5,8±0,4·10 ³	1,4±0,5·10 ⁴
Enterococcus spp.		3,0·10 ³	4,0·10 ¹	9,7·10 ³	1,2±0,8·10 ²	2,1·10 ³	2,9±0,3·10 ²	7,4·10 ³	8,1±1,6·10 ²
E. coli / Enterococcus		0,37	17,5	0,2	10,8	1,3	4,8	0,78	17,2

¹: Densités humaine et animale à l'amont du site échantillonné ; ² : Valeurs en nombre d'habitations ; ³: Pluviométrie 5 jours avant l'échantillonnage ; **N** : Nombre de fosses septiques ; **n** : Nombre de fosses septiques défectueuses ; ^a: Valeurs estimées; ^b: Pluviométrie pendant la période de stabulation des bovins (Novembre 2009); ^c: Pluviométrie pendant la période de pâturage des bovins (Juin 2010). ++, +, +/-, -: fréquence d'animaux sauvages sur le bassin.

dans la zone urbaine à 600 m à l'amont du quatrième site (Risle), des rejets directs d'eaux usées ont été identifiés (Tableau 24). L'ensemble de ces données a été intégré dans une cartographie SIG (Système d'Information Géographique) afin de caractériser la vulnérabilité des eaux de ce bassin versant à la contamination en antibiotiques et bactéries fécales antibiotiques résistantes. Une approche analogue a été utilisée pour caractériser la vulnérabilité des sols à la contamination par les antibiotiques à l'échelle européenne par de la Torre *et al.* (2012).

Afin d'étudier l'impact des pratiques de l'élevage bovin, deux campagnes de prélèvements (4 sites) ont été effectuées en période de stabulation (automne), ou de pâturage (printemps), à l'aide de collecteurs automatiques (ISCO®) afin d'obtenir un échantillon moyenné sur 24h (Figure 19). Ces deux campagnes ont été réalisées pour des conditions hydrologiques similaires avec des apports par ruissellements au voisinage immédiat des cours d'eau (Figure 20). L'hydrogramme de la Risle, exutoire final du bassin versant, montre l'influence rapide de la pluviométrie et des ruissellements associés sur l'augmentation du débit. Les quatre sites ont été équipés de sondes multi-paramétriques (turbidité, conductivité, hauteur d'eau, pression, température) pour permettre des mesures à haute fréquence (pas de temps : 15min). Le site de la Selles a été équipé d'un pluviomètre.

3.2. Consommation en antibiotiques

La collaboration avec l'éleveur et le vétérinaire du site n°2 a permis d'accéder aux données en antibiotiques (pratique d'élevage raisonnée) pour les deux périodes échantillonnées. Les prescriptions de l'exploitation localisée à 4 Km ne sont pas disponibles.

3.3. Analyses chimiques et microbiologiques

La détection et la quantification des résidus d'antibiotiques, l'étude de la structure des populations et la caractérisation des phénotypes d'antibio-résistance d'*E. coli* et d'*Enterococcus* (pour la période de pâturage), y compris les gènes correspondants, ont été réalisées selon les méthodes décrites dans le chapitre 1 et la section « Matériel et Méthodes ».

De façon analogue au chapitre 1, les travaux en microbiologie ont bénéficié de la complémentarité des approches développées en microbiologie environnementale (UMR CNRS 6143 M2C) et en épidémiologie d'*E. coli* (E. Denamur, O. Clermont) ou d'*Enterococcus* (R. Leclercq). La recherche d'*E. coli* pathogènes a été effectuée, à l'INSERM U722, par la détection moléculaire des gènes codant les facteurs de virulence impliqués dans les infections intra-intestinales. Pour les analyses microbiologiques, les volumes d'eau et le

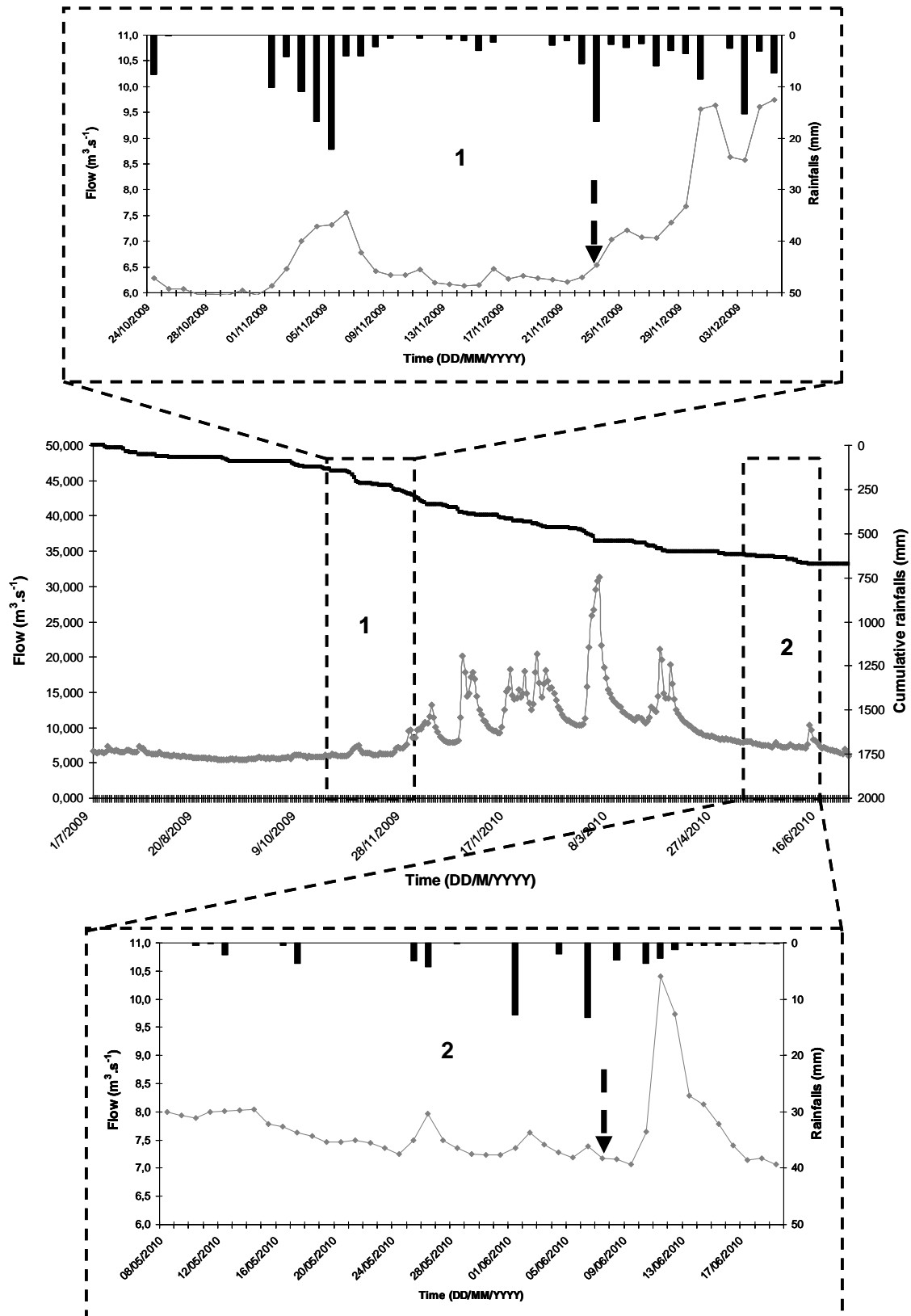


Figure 20: Débit de la Risle ($\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$), pluies cumulées (mm) et pluviométrie (mm) au cours d'une année hydrologique. Les focus ont été réalisés durant les deux campagnes d'échantillonnage : en automne lors de la stabulation des bovins (1) et au printemps lors du pâturage des bovins (2). Les périodes d'échantillonnage sont indiquées par les flèches noires.

nombre de filtrations ont été ajustés afin d'obtenir au moins 35 souches par site et par campagne tout en veillant à avoir au moins 5 colonies par filtre.

4. Résultats et discussion

4.1. Consommations en antibiotiques et contamination des eaux par les résidus d'antibiotiques

Pour les deux périodes échantillonnées, la contamination par les résidus d'antibiotiques ne dépassent jamais 5 ng.L^{-1} , à l'exception de la spiramycine sur le site de la Risle ($22,8 \text{ ng.L}^{-1}$, juin 2010) et la roxithromycine sur celui du Sébec (7 ng.L^{-1} , novembre 2009). Ces résultats sont en accord avec les valeurs observées à l'échelle du bassin versant de la Seine [Tamtam *et al.*, 2008]. Le nombre de molécules quantifiées augmentent le long du gradient d'urbanisation avec 4 à 5 molécules à l'amont et 11 à 12 à l'aval (Tableau 25). Comme déjà observé dans les eaux du continuum hospitalier, l'absence de β -lactamines s'explique par leur faible stabilité dans le milieu récepteur (hydrolyse).

Sur le site de la Selles (n°2), il a été possible d'étudier la relation entre la contamination des eaux et les quantités d'antibiotiques utilisées pour le traitement du cheptel. En comparaison avec les données de consommation obtenues pour le continuum hospitalier (chapitre 1), les quantités prescrites sont 100 à 1000 fois inférieures à celles utilisées en médecine humaine. Aucune des molécules consommées n'a été détectée dans l'eau (Tableaux 25 et 26). Ces résultats s'expliquent par (i) le faible nombre de vaches traitées, (ii) la dégradation des molécules dans les matières fécales puis le sol avant l'arrivée dans les eaux en période de pâturage, et (iii) le stockage du fumier sur des surfaces imperméables en période de stabulation.

4.2. Qualité microbiologique des eaux le long du continuum exploitation bovine – zone urbanisée

En période de pâturage, les densités en *E. coli* et *Enterococcus* augmentent, respectivement d'un facteur 100 et 10, de l'amont à l'aval avec un rapport des densités en *E. coli/Enterococcus* qui varie de 4,8 à 17,5. Selon la directive européenne 2006/7/CE, la qualité des eaux est « bonne » sur les deux sites amont, mais évolue vers une « qualité insuffisante » dès l'entrée dans la zone urbaine (site de Tourville) (Tableau 24 et 27). Ce gradient de contamination microbiologique n'est pas retrouvé en période de stabulation alors que les conditions hydrologiques sont équivalentes. Pour cette période, la qualité microbiologique est « insuffisante » avec des densités en *E. coli* comprises entre $1,0 \cdot 10^3 \text{ UFC} \cdot 100\text{mL}^{-1}$ et équivalentes pour *Enterococcus*, et un rapport des densités *E. coli/Enterococcus* qui varie de 0,2 à 1,3. Considérant que (i) la densité en *E. coli* est 100 fois supérieure à celle

Tableau 25: Quantification des antibiotiques dans les eaux lors de la stabulation (1) et le pâturage (2) des bovins.

Antibiotique	Limite de détection (ng.L ⁻¹)	Limite de quantification (ng.L ⁻¹)	Sebec (ng.L ⁻¹)		Selles (ng.L ⁻¹)		Tourville (ng.L ⁻¹)		Risle (ng.L ⁻¹)	
			1	2	1	2	1	2	1	2
Quinolones & Fluoroquinolones										
Ciprofloxacine	0,5	2	-	-	-	-	-	-	-	-
Enrofloxacin	0,2	0,5	-	2,9	-	3,2	-	-	-	-
Marbofloxacine	0,1	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-
Norfloxacine	0,4	2	-	-	-	-	-	-	-	-
Ofloxacine	0,1	0,3	-	4,7	-	3,3	1,0	2,5	2,0	0,8
Acide pipémedique	0,4	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-
Acide oxilinique	0,1	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-
Fluméquine	0,1	0,2	-	-	-	-	d	d	d	0,3
β-lactamines										
Amoxicilline	100	300	-	-	-	-	-	-	-	-
Ampicilline	40	100	-	-	-	-	-	-	-	-
Pénicilline G	0,4	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-
Pénicilline V	0,7	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxacilline	0,5	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-
Cloxacilline	0,5	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-
Dicloxacilline	2	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-
Céfalexine	0,6	20	-	-	-	-	-	-	-	-
Céfotaxime	0,2	0,007	-	-	-	-	-	-	-	-
Céfpodoxime	100	300	-	-	-	-	-	-	-	-
Ceftiofur	0,2	0,6	-	-	-	-	-	-	-	-
Céfuraoxime	0,3	0,8	-	-	-	-	-	-	-	-
Sulfamides										
Sulfadiazine	0,1	0,3	-	0,5	-	-	-	0,3	-	0,9
Sulfadiméthozine	0,1	0,1	-	-	-	-	-	-	0,1	-
Sulfamérazine	0,1	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-
Sulfaméthazine	0,1	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-
Sulfaméthizole	0,1	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-
Sulfaméthoxazole	0,3	1	-	-	-	-	9,0	-	3,0	3,2
Sulfanilamide	20	70	-	-	-	-	-	-	-	-
Sulfapyridine	0,1	0,3	-	-	-	-	1,0	1,2	1,0	0,5
Sulfathiazole	0,2	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-
Tétracyclines										
Tétracycline	0,3	1	-	-	-	-	-	-	1,0	-
Oxytétracycline	0,4	2	-	-	-	-	-	19,6	-	16,5
Chlortétracycline	6	2	-	-	-	-	-	-	12,0	-
Doxycycline	0,4	2	-	-	-	-	-	-	-	-
Macrolides										
Azithromycine	nd	nd	-	-	-	-	-	4,3	-	-
Clarithromycine	nd	nd	0,1	0,6	0,2	0,4	0,4	2,8	4	1,8
Erythromycine	nd	nd	3,0	0,8	1,0	0,9	1,0	1,5	2,0	1,2
Josamycine	nd	nd	0,3	-	0,2	-	1,0	-	0,5	-
Roxithromycine	nd	nd	7,0	-	0,1	-	0,4	-	4,0	0,7
Spiramycine	nd	nd	-	-	-	-	-	-	4,0	22,8
Tylosine	nd	nd	0,3	-	-	-	-	-	-	-
Triméthoprime	0,1	0,3	-	-	-	-	3,0	1,5	0,3	3,9

-: antibiotique non détecté; d: antibiotique détecté seulement; nd: non déterminé

Tableau 26: Consommation en antibiotiques pour le traitement du cheptel de 450 bovins.

Antibiotique	Quantité d'antibiotique utilisée (mg) entre Octobre 2009 et Novembre 2009*	Quantité d'antibiotique utilisée (mg) entre Mai 2010 et Juin 2010**
Fluoroquinolones		
Enrofloxacin	5720	-
Marbofloxacin	1020	-
β-lactamines		
Pénicilline G	1795	570
Cefquinome	750	-
Aminosides		
Streptomycine	2820	1000
Tétracyclines		
Tétracycline	2000	4000

* 28 vaches parmi 452 ont été traitées ; ** 2 vaches parmi 463 ont été traitées.

Tableau 27: Normes pour la qualité microbiologique des eaux douces intérieures à usage récréatifs pour l'Union Européenne, le Canada et les Etats-Unis.

Indicateurs de contamination fécale			Référence
	<i>E. coli</i> (UFC.100mL ⁻¹)	<i>Enterococcus</i> spp. (UFC.100mL ⁻¹)	
Union Européenne			
Excellente qualité	500 ^(*)	200 ^(*)	Directive 2006/7/CE
Bonne qualité	1000 ^(*)	400 ^(*)	
Qualité suffisante	900 ^(**)	330 ^(**)	
Canada			
Contact primaire ¹	≤ 200	≤ 35	Canadian Recreational Water quality guidelines, 3 ^e édition (2012)
Contact secondaire ²	1000	175	
USA			
Contact primaire ¹	126	33	U.S Environmental Protection Agency (2004)

(*) Evaluation au 95^e percentile ; (**) Evaluation au 90^e percentile ; ¹ : contact complet du corps (natation, plongée sous marine) ; ² : contact partiel du corps (canoë – kayak).

d'*Enterococcus* dans le tractus digestif et que (ii) la survie d'*Enterococcus* dans les bouses est meilleure [Sinton *et al.*, 1998 ; Sinton *et al.*, 2007] : un rapport *E. coli*/*Enterococcus* faible serait le témoin d'une contamination passée ou dont la source de contamination est distante du point de prélèvement, alors qu'un rapport élevé témoignerait d'une contamination récente ou proche. Sur le site amont proche de l'exploitation bovine (site n°2), les apports en bactéries fécales en période de pâturage sont liés aux lessivages de bouses majoritairement récentes. En période de stabulation, une contamination plus élevée avec des densités plus importantes en *Enterococcus* s'expliquerait par un apport d'eaux de ruissellement du fumier entreposé depuis plusieurs semaines sur une surface imperméable.

4.3. Evolution de la structure des populations d'*E. coli* et d'*Enterococcus* le long du continuum

La structure des populations d'*E. coli* et d'*Enterococcus* est différente le long du continuum exploitations bovines – zone urbaine (Tableaux 28 et 29). La distribution des groupes phylogénétiques au sein des populations d'*E. coli* évolue significativement en période de pâturage (p-value = 0.048, $\alpha=0.1$) et de façon plus marquée en période de stabulation (p-value < 0.001, $\alpha=0.05$) le long du continuum (Tableau 28). A l'amont (site n°2), la proximité des rejets de bovins est à l'origine de la forte prévalence d'isolats appartenant majoritairement au groupe phylogénétique B1 (42.0%) alors qu'à l'aval, les effluents de la zone urbaine sont responsables de l'enrichissement en souches d'*E. coli* des groupes phylogénétiques A (40.0%) et B2 (28.9%) [Walk *et al.*, 2007 ; Tenaillon *et al.*, 2010]. De même, l'analyse de la diversité des populations d'Entérocoques montre l'influence du gradient d'urbanisation avec une augmentation de l'abondance d'*E. faecalis* au sein de la population d'*Enterococcus* de l'amont (3.0%) vers l'aval (50.0%) (Tableau 29). L'occurrence élevée de souches d'entérocoques appartenant à l'espèce *E. hirae* (37,0%), majoritairement présente dans les matières fécales des bovins explique les résultats observés sur le site n°2 situé en contrebas de l'exploitation bovine [Thal *et al.*, 1995]. Sur le site aval de la Tourville (site n°3) qui collecte les eaux du Sébec et de la Selles, la présence d'une structure collective, dont l'assainissement non collectif est défectueux, est à l'origine d'un apport important de souches d'*E. coli* du groupe phylogénétique A. A l'exutoire du bassin versant où les eaux de la Tourville se mélangent avec celles de la Risle, des résultats analogues sont retrouvés. Ainsi, le gradient d'urbanisation du bassin versant s'accompagne d'une modification de la distribution des groupes phylogénétiques A et B1 au sein de la population d'*E. coli* circulantes dans les eaux

Tableau 28: Evolution de de la structure des populations d'*E. coli* isolées des eaux le long du continuum exploitation agricole – zone urbanisée.

Site	Pratiques des bovins	N° d'isolats	Structure des populations d' <i>E. coli</i> (%)				Pathogènes intestinaux d' <i>E. coli</i> (n/N)					Gène codant l'intégrase de classe 1 (%)	Antibio-résistance d' <i>E. coli</i> (%)	
			A	B1	B2	D	<i>afaD</i>	<i>aatA</i>	<i>aaiC</i>	<i>eae</i>	<i>stx2</i>		1 or 2 antibiotiques	Au moins 3 antibiotiques
Sebec	Stabulation	49	2,0	6,1	44,9	47,0	0/49	0/49	0/49	0/49	0/49	2,0	2,0	2,0
	Pâturage	50	34,0	52,0 ^c	6,0	8,0	0/50	0/50	0/50	0/50	0/50	0,0	32,0	8,0 ^b
Selles	Stabulation	50	16,0 ^a	42,0 ^a	16,0	26,0	0/50	0/50	0/50	0/50	1/50	0,0	4,0	0,0
	Pâturage	52	28,8	53,8	2,0	15,4	0/52	0/52	0/52	0/52	1/52	1,9	5,8	1,9
Tourville	Stabulation	48	50,0	29,2	8,3	12,5	0/48	0/48	0/48	0/48	0/48	10,4	10,5	14,6
	Pâturage	48	41,7	41,7	4,1	12,5	0/48	0/48	0/48	1/48	0/48	0,0	4,2	4,2
Risle	Stabulation	45	40,0	8,9	28,9	22,2	1/45	1/45	1/45	1/45	0/45	4,4	11,1	11,1
	Pâturage	48	37,5	35,4	14,6	10,4	0/48	0/48	0/48	1/48	0/48	6,3	18,8	29,3

N: Nombre total d'isolats; n: Nombre d'isolats portant un ou plusieurs gènes de virulence; a: P<0.001 vs Risle et Tourville pendant la période de stabulation des bovins; b: P<0.0001 vs pendant la période de pâturage des bovins; c: P=0.048 vs Tourville et Risle pendant la période de pâturage des bovins.

Tableau 29: Distribution des espèces d'entérocoques et antibio-résistance des isolats lors de la période de pâturage des bovins.

Site	N° d'isolats testés	Distribution des espèces d' <i>Enterococcus</i> (%)								Distribution des entérocoques résistant à ¹ (%)	
		<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. durans</i>	<i>E. hirae</i>	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. avium</i>	<i>E. villorum</i>	macrolides	tétracycline
Sebec	10	3/10 ^a	2/10 ^a	1/10 ^a	0/10 ^a	1/10 ^a	3/10 ^a	0/10 ^a	0/10 ^a	5/10 ^a	1/10 ^a
Selles	35	31,0	3,0	3,0	37,0	9,0	11,0	0,0	6,0	14,2	3,0
Tourville	48	8,0	56,0	10,0	0,0	19,0	4,0	2,0	0,0	38,0	33,0
Risle	44	20,0	50,0	7,0	0,0	14,0	7,0	2,0	0,0	34,0	32,0

a : pourcentage non calculé du au faible nombre de souches isolées

Tableau 30: Caractérisation des *E. coli* pathogènes β -D-glucuronidase positives isolées des eaux.

Isolat	Site (n°)	Pathotype	O-type	Groupe phylogénétique	Profil de résistance aux antibiotiques
EC4199	Selles (2)	STEC ¹	O174	B1	-
EC6086	Selles (2)	STEC ¹	O174	B1	-
EC6230	Tourville (3)	aEPEC ²	O153	D/E	-
EC4312	Risle (4)	EAEC ³	nd	A0	-
EC4321	Risle (4)	DAEC ⁴	nd	A1	-
EC4330	Risle (4)	aEPEC ²	O81	B2	-
EC6138	Risle (4)	EPEC ²	O88	B1	CHL

nd : non déterminé ; **CHL** : résistance à la chloramphénicol ; - : souche sensible aux 17 antibiotiques testés (amoxicilline ; amoxicilline + acide clavulanique ; ticarcilline ; ticarcilline + acide clavulanique ; céfalotine ; ceftazidime ; céfotaxime ; imipénème ; tétracycline ; sulfaméthoxazole + triméthoprim ; kanamycine ; gentamicine ; streptomycine ; chloramphénicol ; acide nalidixique ; ciprofloxacine). ¹ : Présence du gène *stx2* ; ² : Présence du gène *eae* ; ³ : Présence des gènes *aatA* et *aaiC* ; ⁴ : Présence du gène *afaD*.

avec une augmentation du phylo-groupe A (majoritairement d'origine humaine), en parallèle à une diminution du phylo-groupe B1 (majoritairement d'origine bovine).

Sur le site n°2, il a été isolé des souches d'*E. coli* O174 entéropathogènes, productrices de shiga toxine (STEC)⁹. Des bovins porteurs sains, au sein du cheptel, expliquent la présence de ces souches dans les eaux (Tableau 30). En considérant que ces souches représentent 2,0% ($2,6 \cdot 10^1$ UFC.100mL⁻¹ et $3,8 \cdot 10^1$ UFC.100mL⁻¹) de la population d'*E. coli* et que la dose infectante est comprise entre 10 et 10² UFC [Hunter *et al.*, 2003], le volume critique¹⁰ associé à un risque de gastro-entérite avec syndrome hémolytique urémique est de 26 mL. Ces souches qui ne sont plus présentes dans les eaux à l'aval du continuum ont été isolées sur ce site pour les deux périodes alors qu'en période de pâturage, la qualité microbiologique était « bonne » (directive 2006/7/CE). En revanche, d'autres souches entéropathogènes (EPEC, EAEC, DAEC) moins virulentes ont été retrouvées sur les deux sites aval.

4.4. Impact des pratiques d'élevage des bovins sur la structure des populations d'*E. coli* dans les eaux

Dans les eaux du site amont (n°2), où la structure des populations d'*E. coli* est fortement influencée par la proximité de l'exploitation bovine, il n'est pas observé de différences significatives entre les deux périodes. Les souches appartenant au phylo-groupe B1, majoritairement d'origine bovine, sont toujours prédominantes dans les eaux. A l'aval, le long du gradient d'urbanisation, la proportion de souches d'*E. coli* du phylo-groupe A, majoritairement d'origine humaine, est plus important en période de stabulation qu'en période de pâturage. Ces résultats s'expliquent par des apports de souches d'*E. coli* du phylo-groupe B1 plus importants en période de pâturage qu'en période de stabulation (Tableau 28). Pour cette période, une partie des souches du phylo-groupe B1 perdent probablement leur cultivabilité dans les fumiers stockés au sol avant d'être rejetées dans les eaux de ruissellements. Sur le site amont n°1 (Sébec), la différence de structure des populations observée entre les deux périodes est consécutive à la présence d'un nombre important de sangliers. La structure de la population d'*E. coli* présente dans les eaux lors de la campagne de novembre 2009 (période de stabulation) est similaire à celle retrouvée des fèces de ces animaux : A (2,5%), B1 (10,1%), B2 (38,0%) et D (49,4%) (E. Denamur, communication personnelle).

⁹ Dans cette étude, la méthodologie choisie ne permet d'isoler que les souches *E. coli* β-D-glucuronidase positives ce qui exclut les souches pathogènes *E. coli* O157 :H7

¹⁰ Volume d'eau minimal à ingérer pour contracter une gastro-entérite en fonction de la dose infectante

4.5. Impact du gradient d'urbanisation sur la contamination en *E. coli* et *Enterococcus* antibio-résistantes

Pour les deux périodes, la proportion de souches d'*E. coli* et d'*Enterococcus* antibio-résistantes augmente le long du gradient d'urbanisation (Tableaux 28 et 29). Sur le site n°2, peu de souches d'*E. coli* et d'*Enterococcus* antibio-résistantes sont isolées. Ce résultat s'explique probablement par les faibles quantités d'antibiotiques utilisées pour traiter les bovins. L'abondance de souches d'*E. coli* multi-résistantes à au moins 3 antibiotiques augmente significativement d'amont en aval ($p < 0,0001$). De même, l'occurrence de souches d'*E. coli* portant l'intégron de classe 1, évolue de 2% en moyenne à l'amont jusqu'à 5% en moyenne, le maximum étant atteint sur le site n°3 (Tourville) avec 10,4% des souches. Comme pour les résultats du chapitre 1 et en accord avec les observations sur la structure des populations d'*E. coli*, cette augmentation confirme l'origine humaine de ces souches [Ratajczak *et al.*, 2010 ; Laroche *et al.*, 2010 ; Koczura *et al.*, 2011].

La résistance aux macrolides et à la tétracycline des isolats d'*Enterococcus* augmente de l'amont (14,2%) vers l'aval (34,0%). Chez les souches d'*Enterococcus* résistantes à la tétracycline, le gène *tetM* est majoritairement détecté chez les isolats le long du continuum. En revanche, les mécanismes codant la résistance sont différents chez les souches isolées à l'amont, avec une prévalence élevée des gènes *ermB* et *mef* (macrolides) (Tableau 31). Même si le faible nombre de souches nécessiterait de confirmer ces observations, ces résultats sont cohérents avec ceux du chapitre 1 et suggèrent la présence sur les sites amont de souches plus adaptées à l'environnement aquatique, rarement ou pas isolées en milieu hospitalier ou chez l'animal [Lanthier *et al.*, 2010].

5. Conclusions

Les travaux de ce chapitre 2, réalisés le long d'un continuum exploitation bovine – zone urbanisée, pour des pratiques d'élevage bovin contrastées ont montré que (i) un nombre croissant de molécules d'antibiotiques à faibles concentrations (ng.L^{-1}) était détecté dans les eaux le long du continuum; (ii) le gradient d'urbanisation et les pratiques d'élevage bovin influencent la structure des populations d'*E. coli* et d'*Enterococcus* qui circulent dans les eaux ; (iii) la présence d'exploitations bovines peuvent être une source d'*E. coli* productrices de shiga toxine, y compris pour des eaux qui répondent aux critères de bonne qualité microbiologique selon les normes européennes et (iii) les traitements d'antibiotiques modérés

Tableau 31: Distribution des mécanismes de résistance aux macrolides et à la tétracycline parmi les entérocoques isolés des eaux.

Site	N° d'isolats résistants aux macrolides (N)	Mécanismes impliqués dans la résistance aux macrolides (n/N)			N° d'isolats résistant à la tétracycline (N')	Mécanismes impliqués dans la résistance à la tétracycline (n'/N')	
		<i>ermB</i>	<i>mef</i>	Autres genes		<i>tetM</i>	Autres genes
Sebec	5	0/5	3/5	2/5	1	1/1	0/1
Selles	5	1/5	2/5	3/5	1	1/1	0/1
Tourville	20	0/20	3/20	17/20	14	11/14	3/14
Risle	15	0/15	1/15	14/15	13	8/13	5/13

N : Nombre total d'isolats résistant(s) aux macrolides ; **n** : Nombre d'isolat(s) portant un gène de résistance aux macrolides ; **N'** : Nombre total d'isolat(s) résistant(s) à la tétracycline ; **n'** : Nombre d'isolat(s) portant un gène de résistance à la tétracycline.

dans une exploitation agricole qui pratique une démarche d'agriculture raisonnée limiteraient les rejets de souches résistantes aux antibiotiques.

Le long de ce continuum, le profil de vulnérabilité microbiologique des eaux peut être caractérisé par : (i) les densités de populations humaine et animale du bassin versant, (ii) l'origine et la proximité des sources diffuses (ruissellements des sols) qui dépend de la pluviométrie et des pratiques d'élevage (stabulation versus pâturage). Les résultats obtenus dans cette étude sont en accord avec des travaux similaires, menés sur des bassins versants plus importants aux Etats-Unis, en France et au Canada [Webster *et al.*, 2004 ; Servais et Passerat, 2009 ; Lyautey *et al.*, 2010], qui démontrent que la structure des populations d'*E. coli* et d'*Enterococcus* est fortement influencée par la pression anthropique exercée sur les sols. La présence d'une exploitation bovine à proximité d'un cours d'eau pourrait être un indicateur plus pertinent que le dénombrement des indicateurs de contamination fécale pour l'évaluation du risque microbiologique relatif à l'ingestion d'*E. coli* productrice de shiga toxines.

Chapitre 3 :

**Modélisation du fonctionnement hydrologique de la Risle et essais de bilans
quantitatifs des transferts d'*Escherichia coli* à l'aide du modèle conceptuel GR**

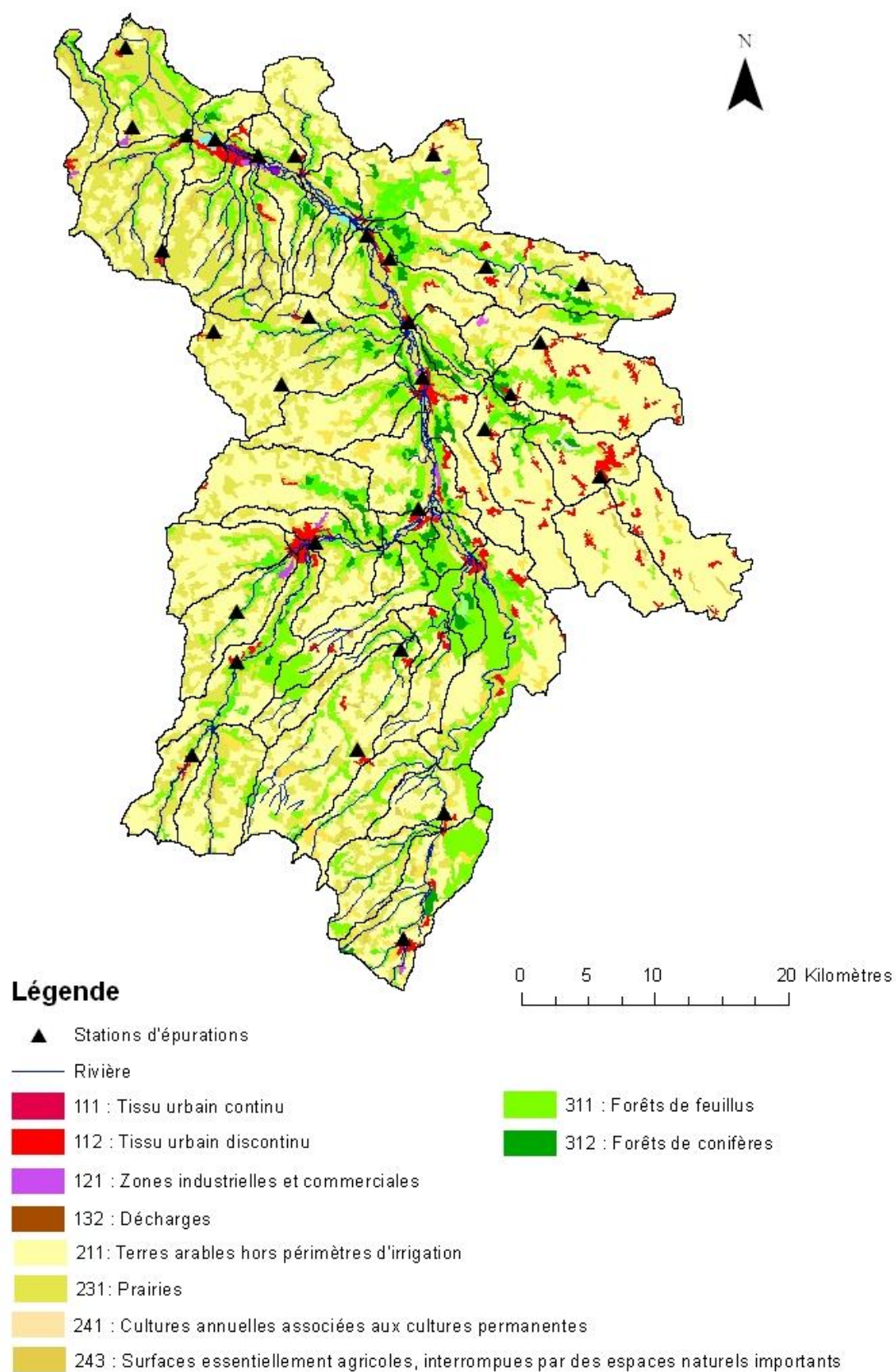


Figure 21: Couverture Corine Land Cover de l'occupation des sols sur le bassin versant de la Risle.

Au cours des deux premiers chapitres de cette thèse, nous avons montré que la contamination des eaux de surface par les antibiotiques était consécutive aux prescriptions et dépendante de la stabilité des molécules. L'usage des sols, la proximité des rejets et les pratiques agricoles sont des paramètres, qui influencent l'abondance et la structure des populations de bactéries fécales circulantes dans les eaux. Des modifications de la diversité des populations en *E. coli* ou *Enterococcus* ont également été montrées à l'échelle d'autres bassins versants [Webster *et al.*, 2004 ; Lyautey *et al.*, 2010 ; Brownell *et al.*, 2007]. Afin de pouvoir, à terme, évaluer les apports en *E. coli*, dont les souches antibio-résistantes, de la Risle à l'embouchure de l'estuaire de Seine, une tentative de bilan des transferts d'*E. coli* a été réalisée à l'échelle du bassin versant de la Tourville, par une approche de modélisation.

Le modèle conceptuel GR (Génie Rural) a été retenu pour l'étude du fonctionnement hydrologique de la Risle à l'échelle de son bassin versant et de ses sous-bassins. L'objectif était de déterminer si ce modèle était applicable pour le contexte géomorphologique de la zone étudiée, et pour la modélisation des transferts de souches d'*E. coli*, dont les souches résistantes aux antibiotiques à l'échelle du bassin versant de la Tourville, au pas de temps journalier. L'acquisition des paramètres hydrologiques a été réalisée à l'aide de sondes multiparamétriques mesurant la turbidité, la conductivité, la hauteur d'eau et la température à l'exutoire de 3 sous-unités du bassin versant de la Tourville. Ce volet intègre une démarche inter-disciplinaire à l'interface entre les hydrologues et les microbiologistes de l'UMR 6143 M2C.

1. Modélisation du fonctionnement hydrologique de la Risle

1.1. Contextes géologique, géomorphologique et hydrogéologique

La Risle (159 Km), avec un bassin versant d'une superficie totale de 2320 Km², prend sa source dans les collines du Perche, département de l'Orne et se jette dans l'estuaire de la Seine au niveau des communes de Berville-sur-Mer et de St Samson-de-la-Roque situées dans le Nord Ouest de la France. Son principal affluent est la Charentonne (100 Km) alimenté lui-même par le Guiel (25 Km).

L'occupation des sols du bassin est caractérisée par 3,1% de zones urbanisées, 23,7% de terres pâturées et 55,7% de terres cultivées (Figure 21), avec 32 stations d'épurations (de 300 à 15 000 équivalent-habitants) réparties sur tout le bassin versant, sources ponctuelles de contaminants.

Le bassin versant de la Risle est formé d'un substrat crayeux, recouvert de formations superficielles d'épaisseurs plus ou moins importantes constituées par des dépôts tertiaires

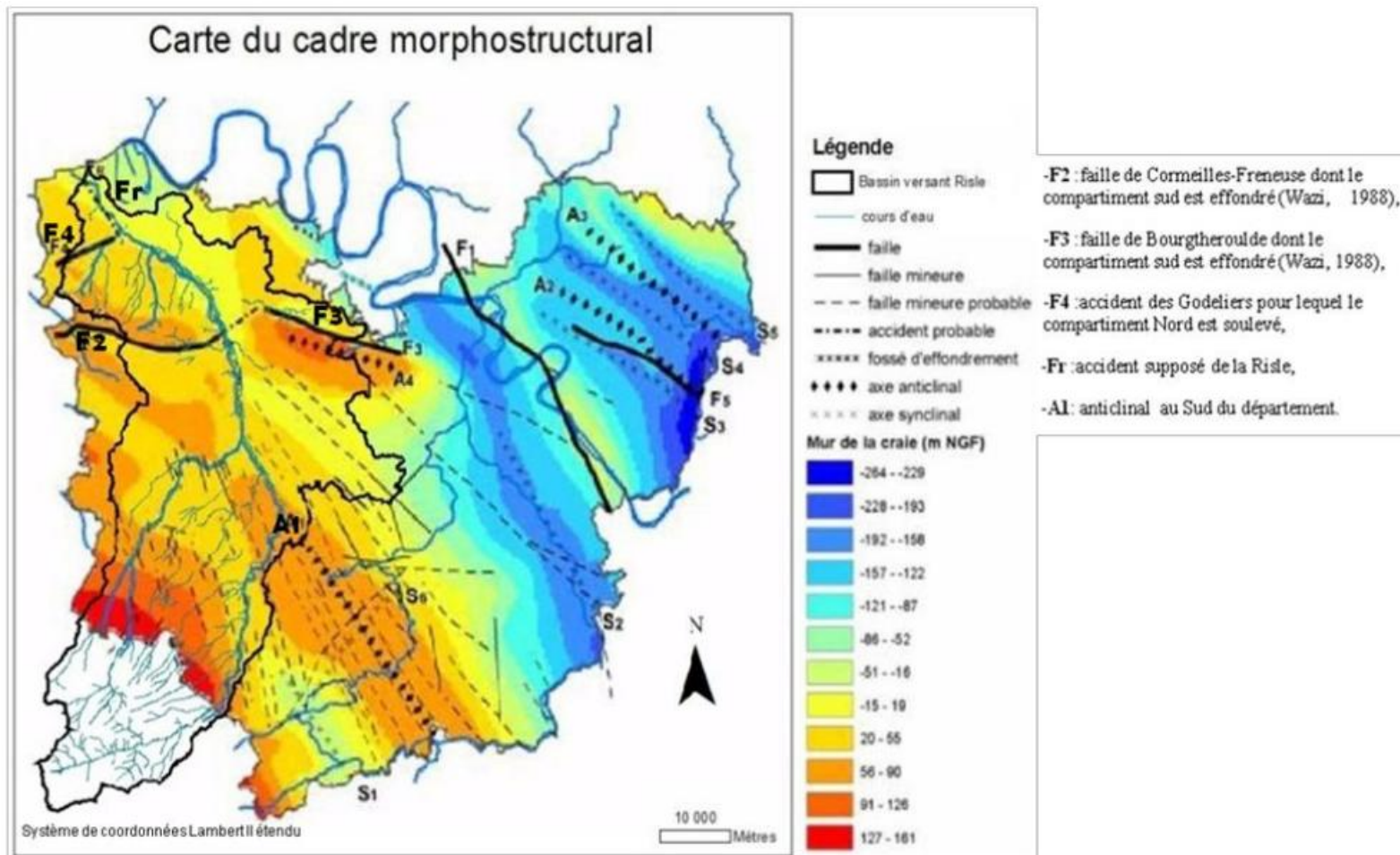


Figure 22 : Contexte structural du département de l'Eure.

Ponctuels, et des argiles à silex résultant de l'altération de la craie [Laignel, 1999 et 2003]. Cette couche d'argiles à silex, ou altérites à silex, diminue d'amont en aval (20 m à 6 m) et est recouverte par des lœss : dépôts sédimentaires d'origine éolienne qui se concentrent au niveau de la jonction entre la Charentonne et la Risle, jusqu'à une trentaine de mètres [Lautridou, 1985, Laignel, 1999 ; Quesnel, 1997]. Les plus faibles épaisseurs sont situées principalement à l'amont et à l'aval du bassin.

Les caractéristiques géomorphologiques régionales sont très différentes selon que l'on se situe au Nord ou au Sud de la Seine [Laignel *et al.*, 2003]. Au Nord, les plateaux sont fortement découpés par des vallées actives et des vallons secs alors qu'au Sud, les vastes plateaux le sont par un réseau hydrographique très pauvre et peu hiérarchisé avec seulement deux rivières principales (Risle, Eure) [Hauchard *et al.*, 2002]. Une analyse globale du relief à l'aide d'un Modèle Numérique de Terrain (MNT, au pas de 50 m) traité par Système d'Information Géographique (SIG) a montré une diminution du relief d'amont en aval, les plus hautes altitudes atteignant 389 m en amont. A partir des nombreuses études sur la région de ce bassin versant, une extrapolation a permis de déterminer le contexte structural du bassin [Juignet, 1974 ; Kuntz et Wyns, 1976 ; Kuntz *et al.*, 1977, 1981, 1982 ; Kuntz et Monciardini, 1985 ; Wazi, 1988]. Ce contexte a ensuite été complété par certains grands axes structuraux tels que l'anticlinal et le synclinal du sud de l'Eure (Valdes, 2005). La figure 22 présente ainsi les principaux accidents structuraux de la région dans laquelle s'insère le bassin versant de la Risle. Trois failles F2, F3, F4, l'accident supposé de la Risle (Fr) qui correspond au recouvrement non visible de roches de deux étages stratigraphiques selon la rive, et l'anticlinal¹¹ A1 sont responsables de la structuration du bassin.

Dans son contexte hydrogéologique, la Risle est soutenue par l'aquifère de la craie, nappe à surface libre dont la surface piézométrique suit le profil topographique à l'exception de quelques exurgences des eaux souterraines : les sources (Figure 23). La Seine est le principal axe de drainage de l'aquifère de la craie, imposant l'écoulement du Sud vers le Nord en rive gauche. La nappe est drainée par les autres cours d'eau régionaux entraînant la division de l'aquifère en plusieurs bassins versants souterrains. En rive droite, plusieurs petits bassins alimentent la Seine, alors qu'en rive gauche, la Risle et l'Eure sont deux grandes sous-unités hydrogéologiques drainées par la Seine (Figure 24a). L'aquifère de la craie possède une géométrie variable et la puissance de la nappe, différence d'altitude entre le niveau piézométrique et le mur de la craie, varie spatialement et temporellement (Figure 23).

¹¹ Pli où les éléments (*i.e* roches) de la courbure étaient à l'origine les plus bas (anciens)

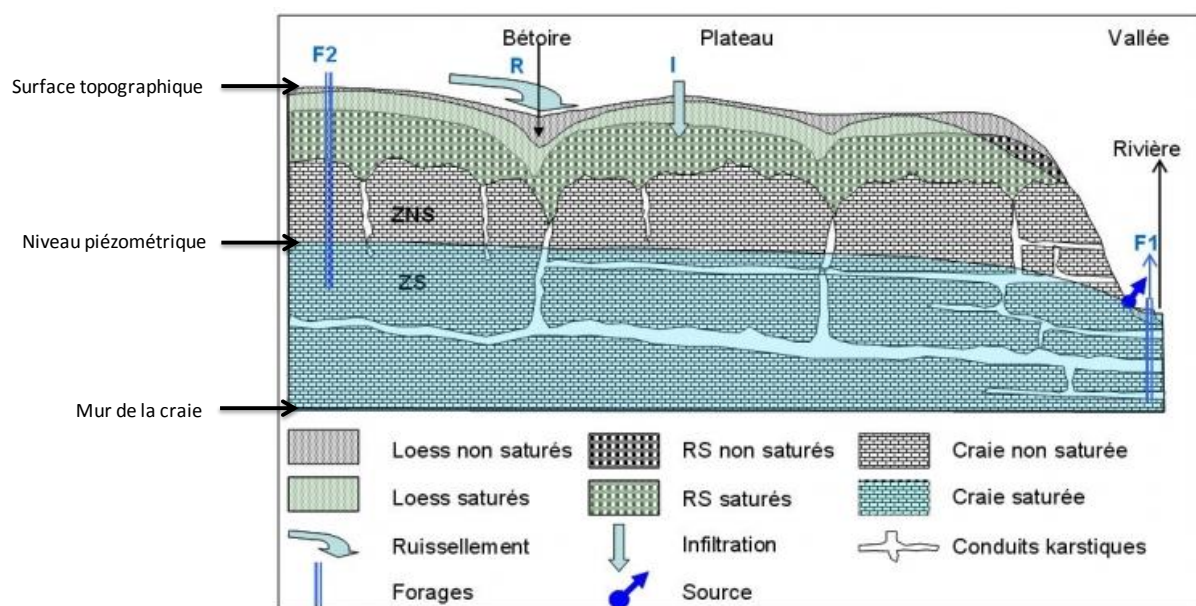


Figure 23 : Schéma du contexte hydrogéologique du bassin versant de la Risle.

Les variations temporelles correspondent aux périodes de recharge (après l'hiver) et de vidange (après l'été) de la nappe. Spatialement, au niveau du bassin versant de la Risle, la puissance diminue d'amont en aval, passant d'une centaine de mètres à moins d'une vingtaine de mètres (Figure 24b).

1.2. Essai de modélisation pluie-débit à différentes stations de l'amont vers l'aval

1.2.1. Collecte des données

Les données de débits au pas de temps journalier sont issues de la Banque HYDRO¹² (www.hydro.eaufrance.fr/). Les données pluviométriques journalières sont issues de onze stations de Météo France réparties sur le bassin versant de la Risle. Huit stations de mesure de débit ont été retenues selon les périodes de mesures disponibles (Tableau 32) et leur localisation d'amont en aval, afin de prendre en compte l'intégralité du bassin versant de la Risle (Figure 25). Des lacunes dans les données hydrométriques ont été comblées en établissant des relations entre stations proches (Jannot, 2010).

Malgré la proximité des stations, leur différence de localisation amont-aval induit nécessairement une non-linéarité dans leur relation au pas journaliers : la réponse hydrologique à un même signal de pluie est normalement plus étalée à l'aval qu'à l'amont en raison de la superficie drainée, et le soutien des nappes est à priori croissant vers l'aval, avec le recoupement de la piézométrie et de la surface topographique. Pour combler l'absence de données, des relations mathématiques non linéaires entre deux stations ont été utilisées, différentes pour les faibles ou les forts débits.

1.2.2. Description du modèle conceptuel GR journalier, mensuel, annuel

Le modèle conceptuel GR a été utilisé aux pas de temps journalier (GR4J - Perrin *et al.*, 2003), mensuel (GR2M - Mouelhi, 2006a) et annuel (GR1A - Mouelhi, 2006b). En entrée, les données pluviométriques (P) et d'évapotranspiration potentielle (E) journalières, mensuelles ou annuelles sont utilisées. Pour les différents modèles, un critère de Nash-Sutcliffe sera déterminé. Une valeur de ce critère supérieure ou égale à 0,6 (60%) validera le modèle.

¹² Données acquises par les services de l'Etat, les directions régionales de l'Environnement, les services de prévision des crues, les directions départementales de l'agriculture et de la forêt, les agences de l'eau, mais aussi d'Electricité de France ou d'organisme de recherche (CEMAGREF, universités,...).

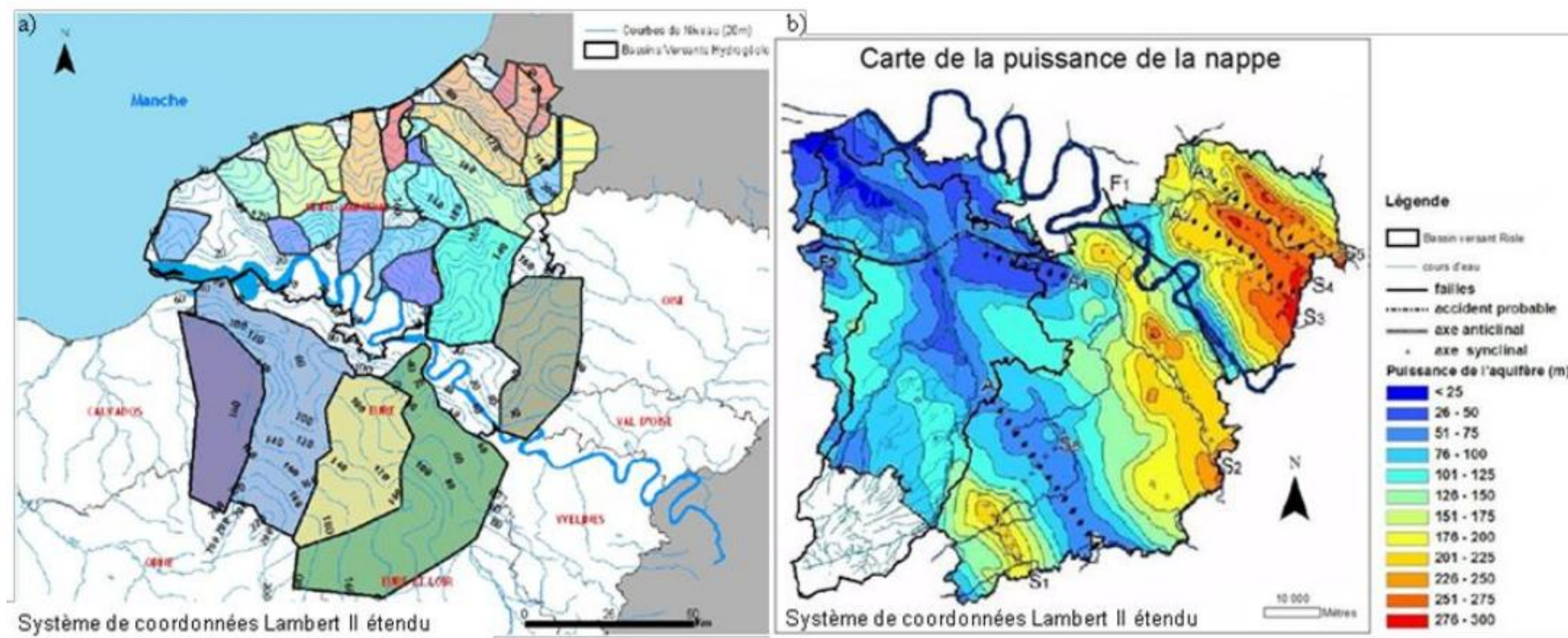


Figure 24: Bassins versants hydrogéologiques en Haute-Normandie (a) et épaisseur de l'aquifère de la Craie dans l'Eure (b).

Tableau 32: Stations de jaugeage sur le bassin de la Risle.

Stations	Codes Station	Coordonnées		Années complètes débits	Bassin versant	Sous Bassin	Superficie bassin versant station (Km2)
		X (lamb II étendu)	Y (lamb II étendu)				
Risle à Rai	R1	470860	2418153	1965-2009	Risle	Risle	149,28
Risle à Grosley-sur-Risle	R2	488665	2449087	1971-1987	Risle	Risle	486,67
Risle à Pont-Authou	R3	480373	2472837	1968-90/2000-2009	Risle	Risle	1800,18
Vernet à Glos-la-Ferrière	V1	472092	2429552	1978/1995	Risle	Risle	19,5
Charentonne à Bocquencé	C1	463840	2429442	1981-2009	Risle	Charentonne	65,82
Charentonne à Trinité-de-Réville	C2	466689	2443857	2002-2008	Risle	Charentonne	224,21
Guie l à Montreuil l'Argillé	G1	464261	2440133	1978-94/1996-2009	Risle	Charentonne	83,31
Corbie à Toutainville	CO1	463932	2486742	1973-1996	Risle	Corbie	66,07

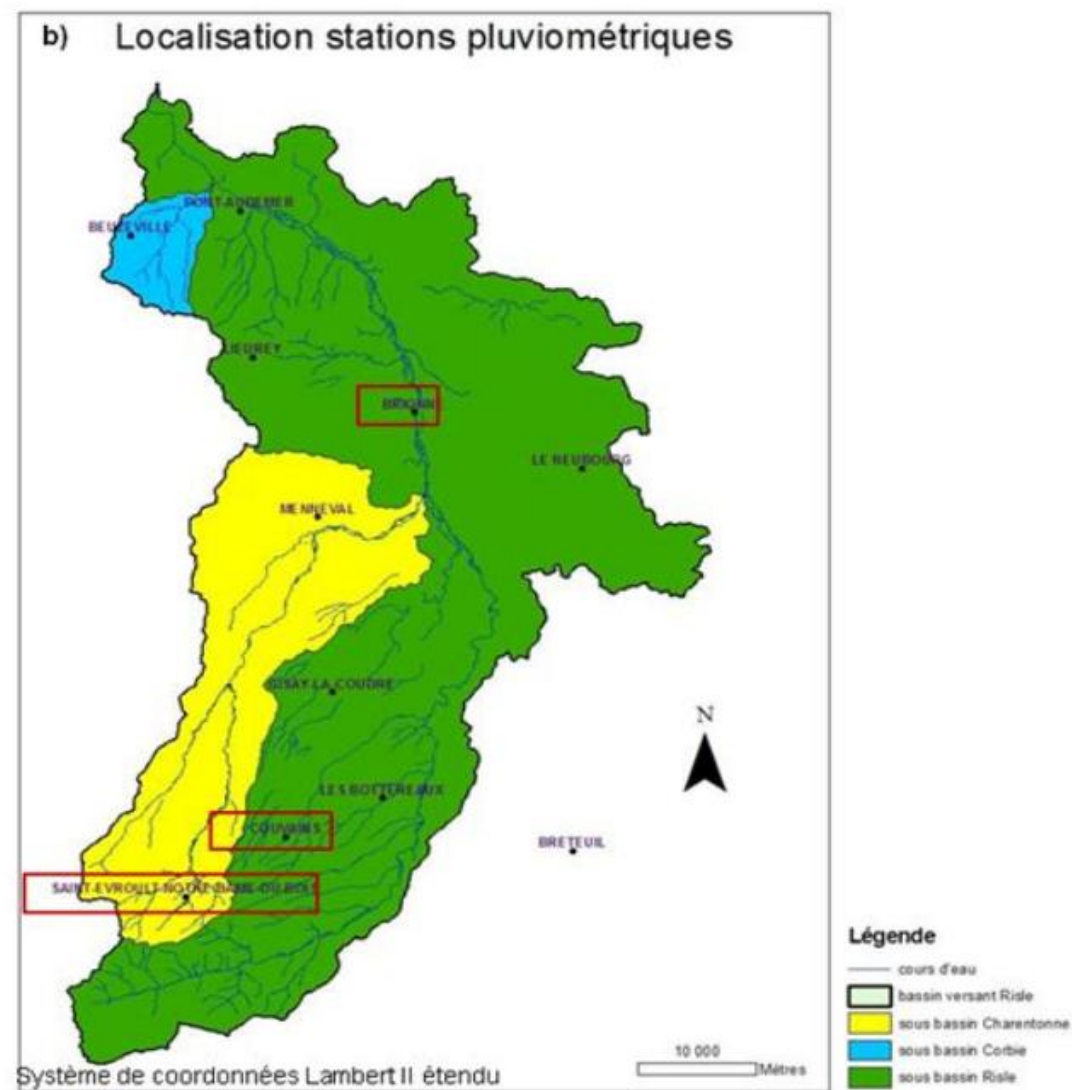
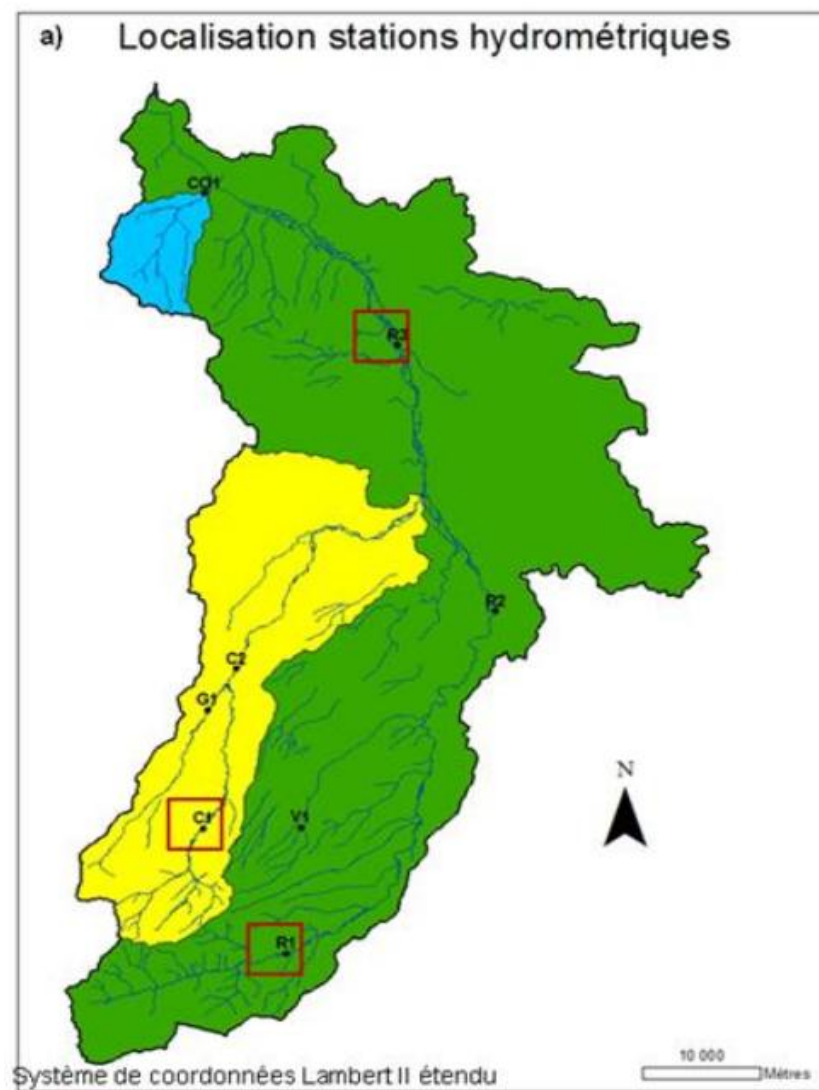


Figure 25: Localisation des stations de jaugeage (a) et des stations pluviométriques sur le bassin de la Risle (b).

1.2.2.1. Le modèle GR4J

Le modèle GR au pas de temps journalier (GR4J) modélise des débits à l'aide de quatre paramètres optimisables (X_1 , X_2 , X_3 et X_4), en fonction des données d'entrée (Figure 26). La variable X_1 correspond à la capacité du réservoir de production contenant les pluies efficaces du bassin versant, la variable X_2 est le coefficient d'échanges souterrains entre deux aquifères, la variable X_3 est la capacité à un jour du réservoir de routage (eau de l'aquifère) et le paramètre X_4 représente le temps de base de l'hydrogramme unitaire¹³. Ce modèle décompose également le débit (Q) des apports de la nappe (Q_r) et des contributions par ruissellements (Q_d).

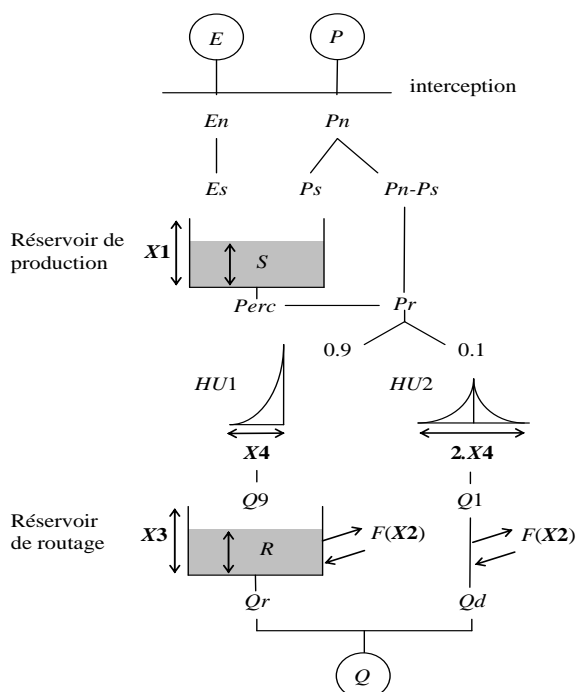


Figure 26: Schéma conceptuel du modèle GR4J [d'après Perrin *et al.*, 2003]

1.2.2.2. Le modèle GR2M

Au contraire du modèle GR4J, le modèle pas de temps mensuel (GR2M) n'utilise que deux paramètres optimisables (X_1 et X_2) en fonction des données d'entrée (Figure 27). Ce modèle tient compte des paramètres du réservoir de production et de l'échange souterrain entre aquifère, comme pour celui au pas journalier. Néanmoins, la capacité du réservoir de routage et le temps de base de l'hydrogramme unitaire ne sont pas optimisables. Les contributions au débit total (Q) ne peuvent pas être déterminées dans ce modèle.

¹³ L'hydrogramme unitaire pour un bassin versant est défini comme l'hydrogramme de débit résultant d'une unité de volume d'écoulement direct, répartie uniformément sur le bassin versant à une vitesse uniforme et pendant un intervalle spécifié.

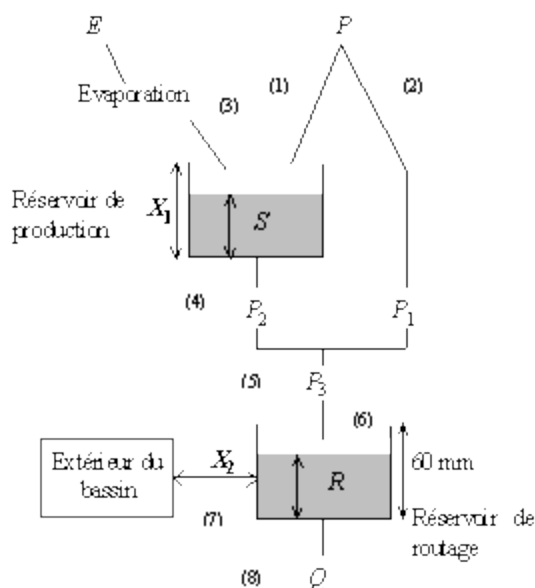


Figure 27: Schéma conceptuel du modèle GR2M [d'après Mouelhi, 2006a]

1.2.2.3. Le modèle GR1A

Le modèle au pas de temps annuel (GR1A) simule des débits en sortie à partir d'un seul paramètre optimisable X , affecté à l'évapotranspiration et qui en variant, va déterminer un volume de sortie égal au volume d'entrée. Ce modèle ne prend en compte aucun des paramètres observés dans les deux modèles précédents à des échelles de temps plus courtes.

1.2.3. Application du modèle GR

Les modèles GR4J, GR2M, et GR1A ont été appliqués aux stations de Bocquencé (C1), Rai (R1), Grosley-sur-Risle (R2), et Pont-Authou (R3) (Figure 28). Les critères de Nash sont présentés dans le tableau 33 pour chaque pas de temps et montrent que les simulations par les différents modèles sont majoritairement valables (valeurs supérieures à 0,6). Les simulations les moins satisfaisantes sont celles issues du modèle au pas de temps annuel (particulièrement pour la station R3).

L'extrême simplicité du modèle GR1A, qui ne comporte pas de réservoir et effectue simplement une équilibration du bilan hydrologique par l'évapotranspiration, explique vraisemblablement ce mauvais résultat : dans des hydrosystèmes présentant de fortes variabilités interannuelles, le pas annuel ne constitue peut-être pas une période de référence assez pertinente pour équilibrer un bilan hydrologique.

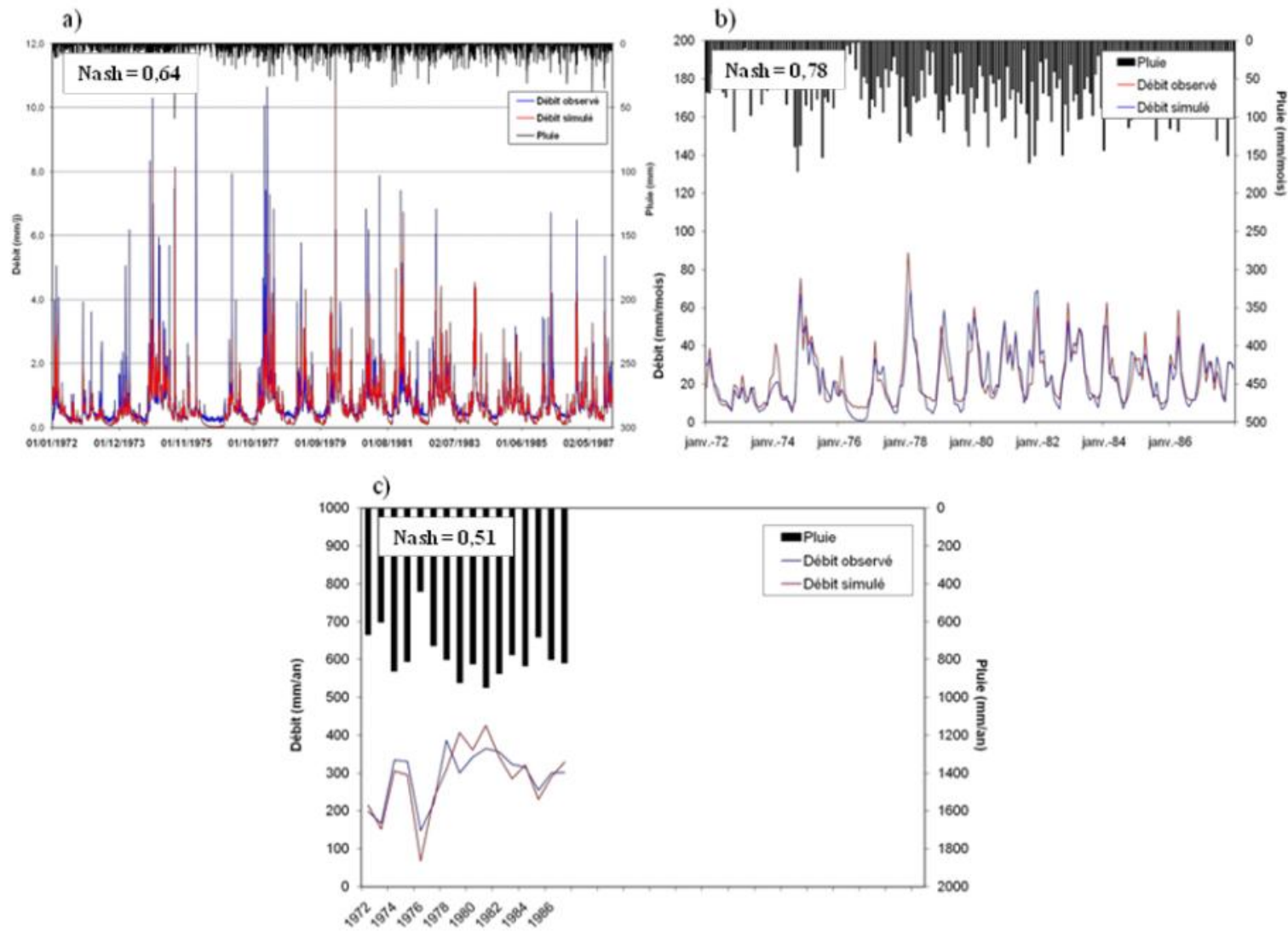


Figure 28 : Résultat du calage des modèles GR4J (a), GR2M (b) et GR1A (c) pour la station de Rai.

Tableau 33 : Critères de Nash-Sutcliffe obtenus après calage des différents modèles pour les quatre stations (Bocquencé, Rai, Grosley-sur-Risle et Pont-Authou).

Critères de Nash (%)			
Stations	GR4J	GR2M	GR1A
C1	79	84	64
R1	64	78	51
R2	73	82	51
R3	67	68	23

Le comportement hydrologique du bassin versant de la Risle semble être bien simulé par les modèles GR4J et GR2M malgré une tendance à sous-estimer ou surestimer légèrement les débits de base selon les années ou les stations considérées. Seul le modèle GR1A ne fonctionne pas de manière satisfaisante. Le caractère karstique du bassin ne semble donc pas altérer les performances du modèle GR car les volumes d'eau en entrée (pluviométrie) et en sortie (débit) sont similaires. Il ressort donc que ce type de modèle conceptuel semble être bien adapté pour la modélisation des flux hydriques à la fois sur la Risle dans son ensemble, et au niveau de sous-bassins, et ce malgré des degrés variables de soutien du débit par la nappe¹⁴. Cette approche de modélisation pourra donc constituer une base adéquate en préalable à la modélisation des transferts d'éléments dissous ou particuliers sur le bassin versant de la Tourville.

2. Premiers essais de modélisation des transferts d'*E. coli* à l'échelle d'un bassin versant

2.1. Choix du bassin versant et modélisation des débits

A l'aide des résultats *in situ* obtenus dans le 2^e volet de cette thèse, nous allons déterminer des bilans quantitatifs en *E. coli* à l'échelle du bassin versant de la Tourville, sous unité de la Risle (Figure 29).

Bien qu'équipé de sondes multi-paramètres (turbidité, conductivité, température, pression, hauteur d'eau), les débits des cours d'eau composant ce bassin versant n'ont pu être déterminés au cours de l'étude. Nous avons donc choisi un autre bassin versant localisé sur la Charentonne, possédant des caractéristiques morphologiques proches, et dont les débits ont pu

¹⁴ Nombreuses connexions entre eaux de surface et eaux souterraines qui ont pu être visualisées en Août 2012 avec l'assèchement de 12 Km de rivière via une perte karstique (bétoire).

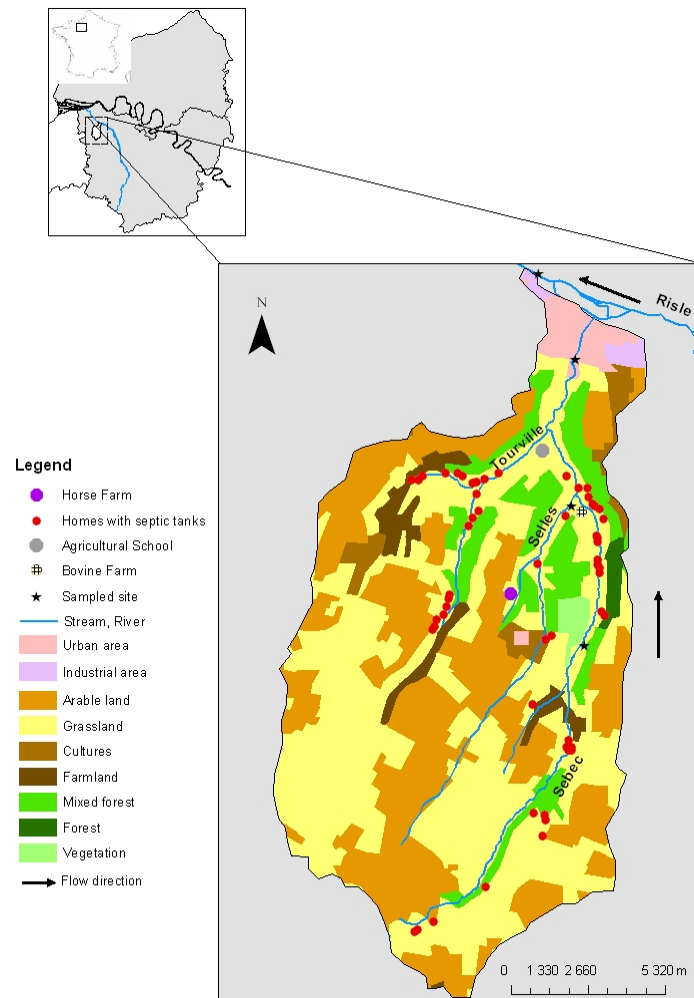


Figure 29: Cartographie du bassin versant de la Tourville et de son usage des sols.

être mesurés au niveau de la station localisée à Bocquencé (C1), afin de paramétrer le modèle GR4J (Figure 30).

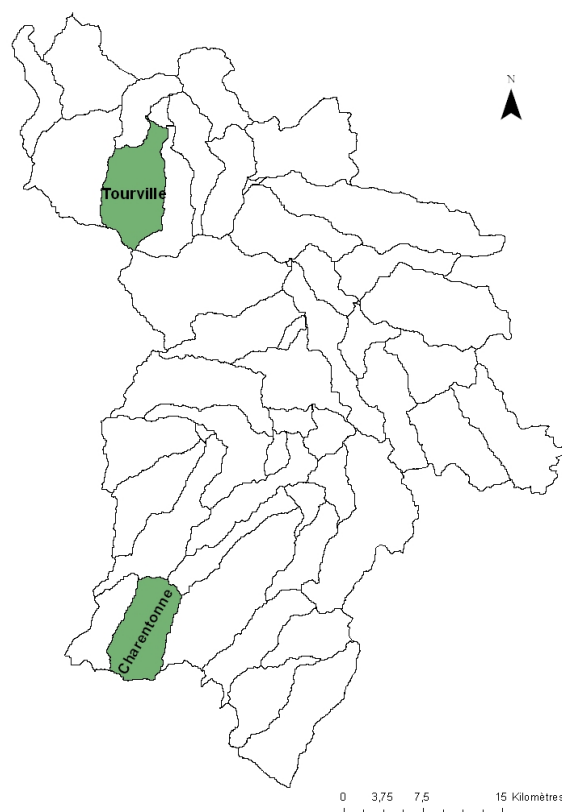


Figure 30: Localisation des sous unités choisies sur le bassin versant de la Risle

La caractérisation morphologique a été déterminée sur la base de (i) l'ordre de Strahler¹⁵ de la rivière à l'exutoire du bassin versant, (ii) l'indice de compacité de Gravelius¹⁶, (iii) la pente du bassin et (iv) l'occupation des sols (Tableau 34).

La comparaison morphologique indique que les bassins versants ont une forme (indice de compacité), une pente, un dénivelé et une occupation des sols comparables permettant de déterminer un critère de Nash-Sutcliffe qui valide le modèle GR4J sur le bassin versant de la Charentonne. Les paramètres de ce modèle seront utilisés pour simuler les débits de la Tourville. La pluviométrie et l'évapotranspiration seront les deux seules variables qui permettront cette modélisation sur le bassin versant de la Tourville (Figure 31).

¹⁵ Classification qui attribue la valeur 1 à un cours d'eau qui ne possède pas d'affluent. Par la suite, un cours d'eau « $n + 1$ » est la résultante de la confluence de deux drains « n ».

¹⁶ Cet indice détermine la forme d'un bassin versant. Une valeur égale à 1 illustre un bassin sphérique alors qu'une valeur supérieure à 1,5 désigne un bassin versant allongé.

Tableau 34: Comparaison morphologique des bassins versants de la Tourville et de la Charentonne à Bocquencé selon plusieurs paramètres

Paramètre	Bassin versant de la Tourville	Bassin versant de la Charentonne
Ordre de Strahler	3	3
Indice de compacité de Gravélius (K_G)	1,69	2,05
Pente du bassin (%)	1,45	0,39
Occupation des sols	Cultures : 38,0% Pâturages : 47,8% Végétation : 11,0% Zone urbaine : 3,2%	Cultures : 57,6% Pâturages : 31,0% Végétation : 11,4% Zone urbaine : 0,0%

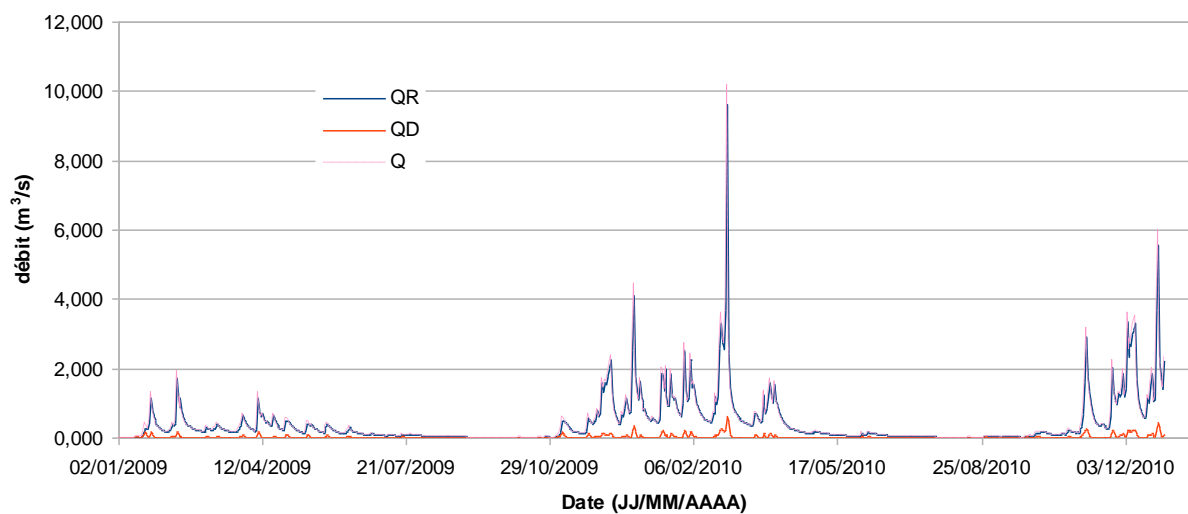


Figure 31: Modélisation du débit total (Q) à partir des contributions par le ruissellement (Qd) et le débit de base (Qr) au niveau du bassin versant de la Tourville

A l'aide du modèle GR4J, il est possible de décomposer, à partir du débit total, les contributions liées aux ruissellements (Qd) et au débit de base (Qr). La comparaison du débit simulé (moyenne journalière) avec celle du débit mesuré (ponctuel, juin 2011) à l'exutoire de la Tourville montre que le modèle prédit une valeur moyenne de $0,013\text{m}^3.\text{s}^{-1}$ pour une valeur ponctuelle mesurée de $0,04\text{m}^3.\text{s}^{-1}$. Le pas de temps explique les différences de valeurs entre le débit simulé (moyenne débit journalier) et le débit observé (mesure instantanée). Ce résultat indique que le modèle transposé sur le bassin versant de la Tourville simule des débits du même ordre de grandeur que ceux observés.

2.2. Premiers essais de modélisation des transferts d'*Escherichia coli*

Les densités en *E. coli* déterminées dans le chapitre 2 ont permis de définir des valeurs de contamination qui vont permettre des premiers bilans quantitatifs en *E. coli* à l'exutoire du bassin versant de la Tourville (Tableau 35).

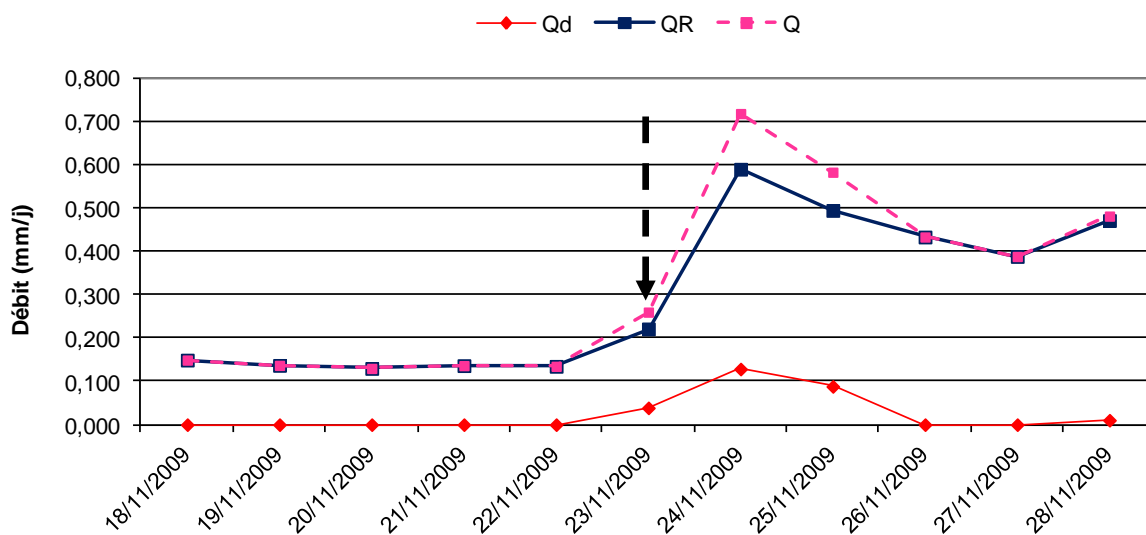
Tableau 35: Densités en *E. coli* dans les eaux du site n°3 (Tourville) durant la stabulation (nov. 2009) et le pâturage des bovins (juin 2010).

	Tourville	
	Nov. 09	Juin 10
<i>Escherichia coli</i> (UFC.100 mL ⁻¹)	$2,8 \cdot 10^3$	$1,4 \cdot 10^3$

Les densités en *E. coli* augmentent le long du gradient de pression anthropique démontrant l'importance des apports de zones urbanisées sur la contamination des eaux. Lors des deux périodes, l'échantillonnage a été réalisé consécutivement à un évènement pluvieux ajoutant au débit de base les apports par ruissellements. A l'aide du modèle GR4J, validé sur la Charentonne et utilisé sur le bassin versant de la Tourville, les contributions au cours d'eau par ruissellement ont pu être quantifiées (Figure 32).

En analysant les chroniques de débits des contributions par ruissellement, les résultats confirment que les prélèvements ont été réalisés dans des conditions similaires avec des apports de masses d'eau par ruissellements du même ordre de grandeur ($0,04\text{ m}^3.\text{s}^{-1}$). A l'aide de ces résultats, il est possible de déterminer des débits théoriques auxquels seront associés des densités bactériennes afin d'alimenter le modèle GR4J au pas journalier. A l'aide des résultats de modélisation et des études *in situ* réalisées sur plusieurs bassins versants, des niveaux de contamination ont été déterminés selon les contributions des ruissellements au débit total (Tableau 36).

A.



B.

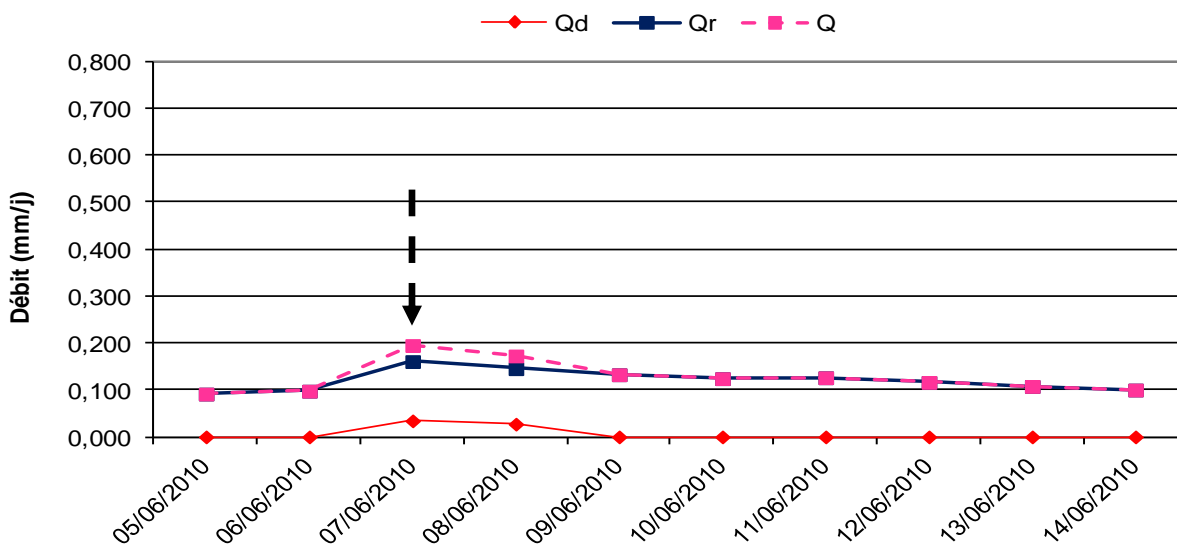


Figure 32 : Modélisation des débits (Q) à la Tourville et des contributions du débit de base (Qr), des ruissellements (Qd) au cours de la campagne de novembre 2009 (A) et de juin 2010 (B). Les périodes d'échantillonnages de novembre 2009 et juin 2010 sont spécifiées à l'aide d'une flèche noire.

Tableau 36: Densités en *E. coli* retenues selon les contributions des ruissellements au débit total

	Faible ¹	Moyen ²	Elevée ³
Contributions des ruissellements (mm.j ⁻¹)	0 – 0,02	0,02 – 0.1	> 0,1
Densité en <i>E. coli</i> (UFC.100 mL ⁻¹)	1,5·10 ²	2,1·10 ³	4,0·10 ⁴

1 : valeur minimale relevée dans plusieurs cours d'eau en absence de ruissellements

2 : valeur moyenne retrouvée lors d'évènements de ruissellements au voisinage immédiat des cours d'eau

3 : valeur maximale de contamination retrouvée lors d'un évènement orageux (Ratajczak *et al.*, 2010)

Avec des hauteurs d'eau variant de 0,5 m à 1 m, il a été considéré que la contamination en *E. coli* était homogène le long de la colonne d'eau. La modélisation des flux d'*E. coli* à l'exutoire du bassin versant montre des valeurs variant de 10³ UFC par jour (débit de base) à plus de 10⁹ UFC par jour. Les valeurs maximales de flux sont majoritairement atteintes l'hiver (période de ruissellements fréquents) et plus rarement lors de périodes estivales avec des contributions des ruissellements liées aux évènements orageux (Figure 33).

Si on s'intéresse au transfert de souches d'*E. coli* résistantes à au moins un antibiotique, il faut distinguer les périodes de stabulation et de pâturage des bovins. En considérant les résultats *in situ* obtenus précédemment sur ce bassin versant, il a été déterminé qu'en période de stabulation des bovins (novembre – février), 25% des souches étaient résistantes à au moins un antibiotique alors qu'en période de pâturage (mars – octobre), 8% de la population d'*E. coli* était résistante. A partir de ces données, des flux ont été modélisés au pas de temps journalier à l'aide du modèle GR4J (Figure 34). De façon analogue à la modélisation des flux de la population totale d'*Escherichia coli*, le transfert de souches résistantes à au moins un antibiotique est maximale (10⁹ *E. coli* résistantes par seconde) lors des périodes hivernales (novembre à février) du à (i) la fréquence élevée des ruissellements et (ii) à la pression humaine exercée par la structure scolaire sans assainissement collectif. Lors du pâturage des bovins (mars à octobre), les apports d'*E. coli* antibio-résistantes sont compris entre 10² et 10⁶ UFC par seconde.

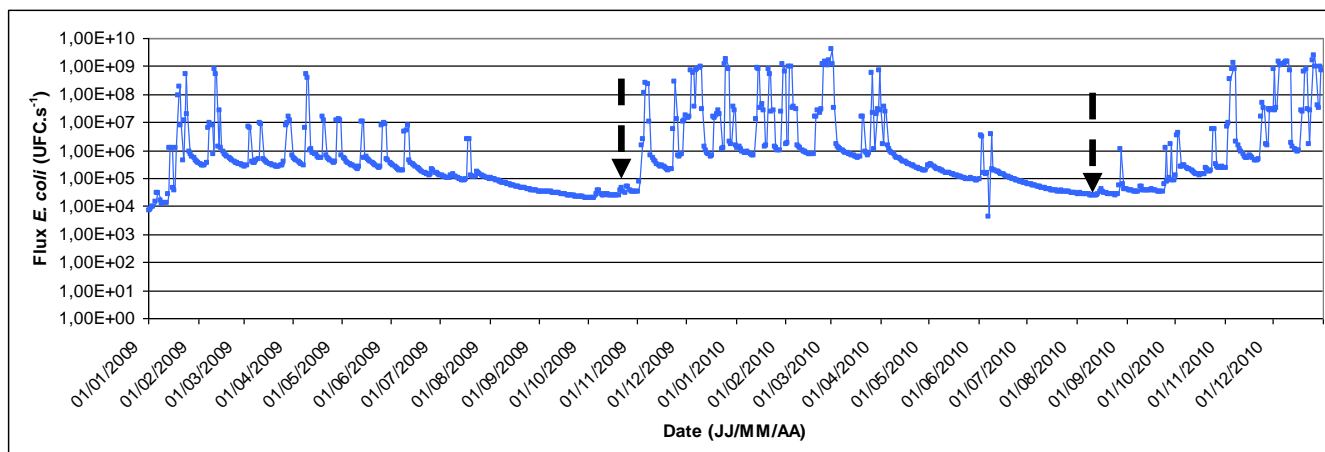


Figure 33: Flux d'*E. coli* à l'exutoire du bassin versant de la Tourville selon les données de débits du modèle GR4J. Les flèches noires désignent les périodes échantillonnées.

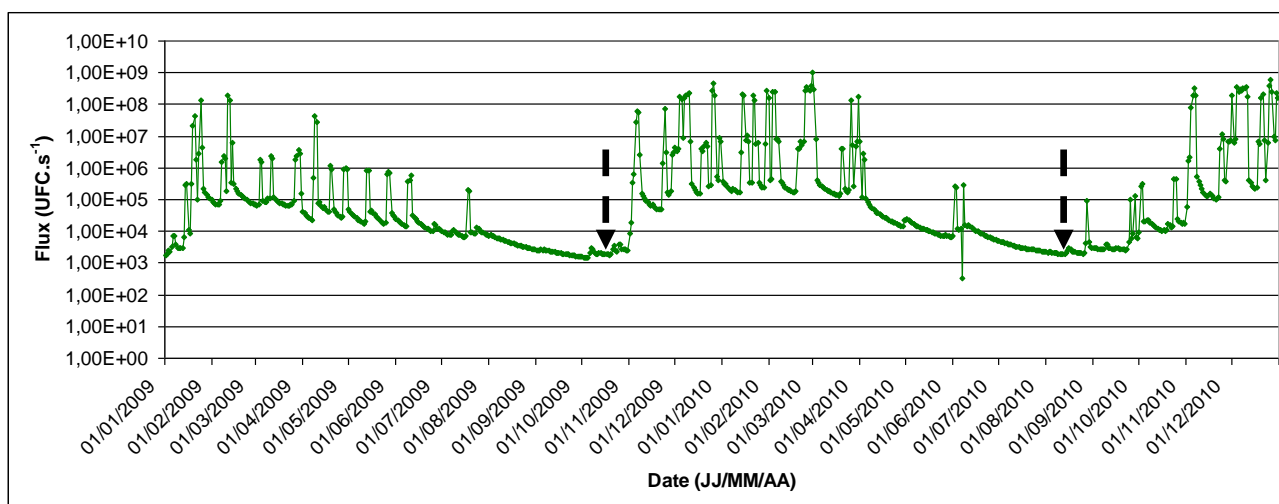


Figure 34: Flux d'*E. coli* résistantes à au moins un antibiotique à l'exutoire du bassin versant de la Tourville. Les flèches noires désignent les périodes échantillonnées.

3. Conclusions et perspectives

Dans ce troisième chapitre de thèse, nous avons montré que (i) le modèle conceptuel GR simulé de façon correcte les débits du bassin versant de la Risle au pas de temps journalier (GR4J) et mensuel (GR2M) et (ii) les premiers essais de modélisation de bilans quantitatifs en *E. coli* étaient majoritairement dépendants des périodes de ruissellements fréquents (hiver, orage).

En perspective de ces travaux, une courbe de tarage¹⁷ devra être réalisée afin de déterminer les débits du bassin versant de la Tourville et d'estimer si la comparaison morphologique des bassins versants est une méthode suffisamment robuste pour pouvoir extrapoler des débits à d'autres bassins versants. Ce dernier point constitue actuellement l'un des aspects cruciaux dans les recherches en cours en sciences hydrologiques, à savoir la problématique d'estimation des débits dans les bassins versants non jaugés. Des campagnes de prélèvements devront être réalisées pour enrichir le nombre d'échantillons et l'influence de différentes conditions hydrologiques (période sèche, orage) afin de valider ces premiers essais de modélisation. En complément, une approche multi-critères de cartographique a également été initiée afin de déterminer l'importance de l'occupation des sols sur la vulnérabilité des eaux en bactéries fécales à l'échelle d'un bassin versant (Annexe). Cette approche s'est inspirée de celle utilisée par le Bureau de Recherches Géologiques et Minières (BRGM) pour la vulnérabilité karstique (méthode paprika). La simulation des apports en contaminants chimiques (antibiotiques) par ce modèle conceptuel serait possible pour les résidus les plus persistants dans les environnements aquatiques (quinolones, macrolides, sulfamides). Toutefois, l'adsorption aux particules des contaminants chimiques (antibiotique) et microbiologiques (*E. coli*), processus majeur dans le devenir de ces contaminants mériterait d'être pris en considération.

¹⁷ Courbe permettant de mettre en relation la hauteur d'eau avec une valeur de débit

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les travaux de thèse réalisés ont montré qu'à l'échelle d'un bassin versant aux usages des sols contrastés (pâturage, cultures, zone urbaine avec un centre de soins), les eaux sont contaminées en antibiotiques et bactéries antibio-résistantes issus des rejets de STEP et des ruissellements et/ou lessivages de sols pâturés. Les quantités d'antibiotiques consommées sont 1 000 fois supérieures en médecine humaine comparativement à la médecine vétérinaire. La contamination des eaux en résidus d'antibiotiques, est consécutive à leurs usages en médecines, et à la persistance des molécules en fonction de leurs propriétés physico-chimiques. Les quinolones/fluoroquinolones, les macrolides et les sulfamides sont les principales familles retrouvées dans les eaux. Toutefois, les concentrations en antibiotiques (du $\mu\text{g.L}^{-1}$ au ng.L^{-1}) observées dans les eaux sont inférieures à celles responsables de la sélection de bactéries antibio-résistantes (mg.L^{-1}). En parallèle à cette contamination par des résidus d'antibiotiques, des souches d'*E. coli* et d'*Enterococcus* antibio-résistantes sont isolées des eaux, et leurs phénotypes d'antibio-résistance ne correspondent pas aux molécules d'antibiotiques retrouvées dans ces environnements. Dans le centre de soins, le traitement de longue durée aux antibiotiques (maison de retraite) favorise l'émergence de souches multi-résistantes aux antibiotiques. Chez les souches d'*E. coli*, La présence d'éléments génétiques portant plusieurs gènes de résistance aux antibiotiques (*e.g* intégrons), expliquent que des phénotypes de résistance ne correspondent pas aux prescriptions.

En perspective à ces travaux, la recherche de gènes de résistance aux antibiotiques par détection moléculaire sera réalisée sur des sédiments prélevés dans des vasières situées le long du continuum STEP – Risle – Embouchure de Seine. Cette étude permettra de déterminer l'impact des apports de la Risle, sur l'enrichissement du « résistome » environnemental. Le devenir des antibiotiques les plus persistants (macrolides, quinolones/fluoroquinolones, sulfamides) sera également déterminé au niveau de ces zones de dépôts, et dans les organismes filtreurs (moules).

Dans cette étude, nous montrons que la structure des populations d'*E. coli* et d'*Enterococcus* évolue le long des deux continuums du bassin versant, suggérant une perte de cultivabilité préférentielle de souches hospitalières, notamment *E. faecium* CC17 et *E. coli* portant des intégrons, au profit de souches environnementales. Chez *Enterococcus*, ces souches environnementales sont parfois résistantes aux antibiotiques mais les supports génétiques sont différents. Ces résultats sont en accord avec des études réalisées au

laboratoire (Thèse M. Ratajczak), et devront être approfondis sur la population d'*Enterococcus* isolés des eaux et du sédiment, à l'échelle des deux continuums.

Dans ces travaux, nous démontrons que des souches d'*E. coli* productrices de shiga toxine (STEC) sont isolées à proximité d'une exploitation bovine (porteurs sains), alors que la qualité microbiologique des eaux est qualifiée de « bonne » selon les densités des deux indicateurs retenus par la directive 2006/7/CE. La présence de ces souches indique que l'usage des sols et notamment la proximité des exploitations bovines seraient de meilleurs indicateurs pour l'évaluation du risque microbiologique dans les eaux.

Des premiers essais de modélisation, à l'aide du modèle GR, ont montré que les flux d'*E. coli* à l'exutoire du bassin versant étaient maximaux lors des périodes de ruissellements intenses (hiver, orage). Ces essais devront être poursuivis par un échantillonnage réalisé lors d'autres conditions hydrologiques (période sèche, orage) avec une gamme de débits, représentative du fonctionnement hydrologique du bassin versant. L'échantillonnage des eaux au cours de différentes périodes permettra de déterminer la part du bruit de fond et de l'évènementiel dans la contamination microbiologique des eaux. D'autres modèles mathématiques, notamment le modèle Sénèque, n'intègrent pas ces événements car le pas de temps utilisé est décadaire. Il est donc difficile de déterminer la part de l'évènementiel (de quelques heures à deux jours) sur une valeur moyennée de 10 jours. L'approche retenue dans ces travaux a permis de quantifier des flux d'*E. coli* au pas de temps journalier et en conditions de ruissellement au voisinage immédiat des cours d'eau. Dans l'avenir, il sera donc nécessaire de poursuivre en intégrant des campagnes de prélèvements, après un événement orageux afin d'intégrer les apports d'*E. coli* consécutif à des événements intenses.

MATERIEL ET METHODES

1. Sites d'étude et stratégie d'échantillonnage

1.1. Description du bassin versant de la Tourville : un site atelier

Le bassin versant de la Tourville a une superficie de 52 Km² et représente une sous unité du bassin versant hydrologique de la Risle (2320 Km²). Il est localisé à l'ouest du bassin parisien et dominé par un climat océanique. Ses contextes géologiques et géomorphologiques sont similaires à ceux retrouvés à l'échelle du bassin de la Risle avec un massif crayeux karstifié recouvert d'altérites à silex. Les cours d'eau qui le compose sont deux ruisseaux d'ordre 1 (Sébec, Selles) et une rivière d'ordre 3 : la Tourville qui est le dernier affluent de la partie aval de la Risle (Ordre 4). L'usage des sols très contrasté est représentatif à celui observé sur le bassin versant de la Risle. Ce site atelier a été équipé, en collaboration avec des hydrologues (UMR M2C), pendant 3 ans de sondes multi paramètres (Troll 9500, *In-situ* Inc) permettant la mesure à haute fréquence (pas de temps de 15 min) de paramètres physico-chimiques tels que la turbidité, la conductivité électrique, la hauteur d'eau, la température. Les données ont été relevées tous les mois mais malgré cela, des problèmes techniques (batteries hors-services, température extérieure inférieure à -10°C empêchant de décharger les données, fuite du joint d'étanchéité, capteur de turbidité hors-service) ne nous ont pas toujours permis d'obtenir les données. En parallèle de ces mesures, la contamination en antibiotiques et en bactéries fécales dont celles résistantes aux antibiotiques a été étudiée le long de deux continuums localisés sur ce bassin versant. Ces continuums ont été équipés d'échantillonneurs automatiques (ISCO®) contenant des flacons en polyéthylène pour les eaux destinées aux analyses microbiologiques (UMR M2C) et des flacons en verre pour la recherche de résidus médicamenteux (UMR EPOC).

1.2. Le continuum hospitalier

Le continuum hospitalier est composé d'un centre de soin, d'une station d'épuration et de son rejet dans la rivière (Figure 17). Le centre de soin est constitué d'un hôpital (87 lits) et d'une maison de retraite (180 lits) où les temps de séjour des patients sont respectivement de 4 à 28 jours et en moyenne 10 ans. La consommation en antibiotiques et la fréquence des traitements a été déterminée en collaboration avec les pharmaciens du centre hospitalier et de la ville. Les eaux usées du centre de soin et des habitations sont collectées par un réseau unitaire jusqu'à l'unique station d'épuration de la zone d'étude. Pour le traitement des eaux usées, la station d'épuration utilise un traitement primaire avec le dégrillage/désablage,

l'aération séquentielle et un clarificateur primaire, et un traitement secondaire avec un système de boues activées et un clarificateur secondaire. Les eaux traitées sont alors rejetées dans la Risle avec un débit journalier de 2500 m³/j en période sèche et de 4300 m³/j en période pluvieuse.

1.3. Le continuum agricole

Le continuum agricole comprend tout le bassin versant de la Tourville jusqu'à son exutoire dans la Risle (Figure 19). L'amont de ce continuum est principalement composé de pâturages (47,8% de la surface totale), de terres arables (38,0% de la surface totale) et de végétation (11,0% de la surface totale) alors que l'aval est représenté par une zone urbaine (3,2% de la surface totale) où est localisé le continuum hospitalier. Le premier site échantillonné le long de ce continuum est situé dans le ruisseau du Sébec (n°1) au niveau d'une zone forestière et à 4 Km en aval d'une ferme d'élevage n°1 (200 bovins) où la consommation en antibiotiques du cheptel n'est pas connue. Le deuxième site se trouve dans le ruisseau de Selles à proximité d'une ferme d'élevage pilote n°2 (450 ± 10 bovins) où les consommations en antibiotiques sont connues et utilisés avec une démarche d'usages raisonnés pour l'environnement. Le troisième site correspond à la Tourville, rivière qui collecte toutes les eaux provenant de l'amont, du Sébec et de la Selles. A 1 Km à l'amont du point de prélèvement se situe un lycée agricole dont les fosses septiques collectant les eaux usées de 500 personnes présentes toute l'année datent de l'époque de la construction du château et sont très probablement défectueuses (1936). Enfin, le site d'échantillonnage localisé dans la Risle, au niveau de l'exutoire de la Tourville, est au milieu de la zone urbaine de 9058 habitants. Les eaux de la Tourville se mélangent ainsi avec celles de la Risle provenant de l'amont où l'usage des sols est plus urbanisé. Le long de ce continuum, l'efficacité de traitement des eaux usées s'améliore de l'amont avec l'utilisation de fosses septiques (quelques dizaines d'habitations) vers l'aval où les eaux de la zone urbaine sont collectées par une STEP. Toutefois, la station d'épuration (continuum hospitalier) n'impacte pas le site de prélèvement Risle situé 1 Km à l'amont. Enfin, des rejets directs ont pu être mis en évidence pour les habitations du centre ville de la zone urbaine.

1.4. Stratégie d'échantillonnage

Le long du continuum hospitalier, les échantillons d'eau ont été prélevés lors (i) d'une période de faible épidémiologie (juin 2009) relative à une faible consommation d'antibiotiques et (ii) d'une période de forte épidémiologie (décembre 2009) liée à une consommation maximale d'antibiotiques. En juin 2009, les échantillons d'eaux usées de

l'hôpital et de la maison de retraite ont été prélevés ponctuellement alors que les effluents bruts et traités de station d'épuration sont moyennés sur 24h à l'aide d'un collecteur automatique ISCO qui prélève 1L par heure. En décembre 2009, tous les prélèvements ont été moyennés sur 24h.

Les eaux du continuum agricole ont été collectées via des collecteurs automatiques ISCO pendant 24h puis moyennées. Ces prélèvements ont eu lieu lors de deux périodes contrastées par leur intensité d'usage des sols. Une première campagne (novembre 2009) s'est déroulée lorsque les bovins, omniprésents à l'amont du bassin versant, étaient en stabulation. Une deuxième campagne (juin 2010) a eu lieu lorsque les bovins pâturaient sur les parcelles. A ces usages contrastés s'ajoute également un gradient d'anthropisation de l'amont (pâturage, terres cultivées) vers l'aval (zone urbaine) du bassin versant.

Pour toutes les campagnes, chaque prélèvement est stocké à $6 \pm 2^{\circ}\text{C}$ et analysé dans les 8h à 10h après le prélèvement pour la microbiologie et filtré puis stocké à -20°C pour la détection et quantification des antibiotiques.

2. Milieux de culture

- **Milieu LB** (Lysogenic Broth) : 10 g.L⁻¹ de bacto-tryptone (DIFCO Laboratories, USA) ; 5 g.L⁻¹ d'extrait de levure (DIFCO Laboratories, USA) ; 5 g.L⁻¹ de NaCl ; pH 7 (Lennox, 1955). Le milieu gélosé correspondant est additionné de 14 g.L⁻¹ d'agar technique en poudre (AES Laboratoires, France).
- **Rapid'E. coli** : 10 g.L⁻¹ de peptones ; 5 g.L⁻¹ de NaCl ; 3 g.L⁻¹ d'extrait de levure ; 6 g.L⁻¹ de substrats sélectifs chromogéniques de la β -D-glucuronidase et de la β -D-galactosidase ; 13 g.L⁻¹ d'agar ; pH 7,2 (Biorad, USA).
- **Rapid'Enterococcus** : 27 g.L⁻¹ de mélange peptidique ; 5 g.L⁻¹ d'extrait de levure ; 5 g.L⁻¹ de chlorure de sodium ; 0,15 g.L⁻¹ de mélange sélectif ; 90 mg.L⁻¹ de substrats sélectifs chromogéniques de la β -D-Glucosidase ; 9 g.L⁻¹ d'agar ; pH 7,7 (Biorad, USA).
- **Slanetz** : 20 g.L⁻¹ de peptone ; 5 g.L⁻¹ d'extrait de levure ; 2 g.L⁻¹ de glucose ; 4 g.L⁻¹ de phosphate dipotassique ; 0,4 g.L⁻¹ d'azide de sodium ; 0,1 g.L⁻¹ de Triphenyl Tetrazolium Chloride (T.T.C) ; 10 g.L⁻¹ d'agar ; pH 7,2 (AES Laboratoires, France)

- **Mueller-Hinton** : 2 g.L⁻¹ d'infusion de viande de bœuf ; 17,5 g.L⁻¹ d'hydrolysate acide de caséine ; 1,5 g.L⁻¹ d'amidon ; 17 g.L⁻¹ d'agar ; pH 7,3 (AES Laboratoires, France).

3. Analyses microbiologiques des échantillons

3.1. Dénombrements d'*Escherichia coli* et d'*Enterococcus* spp.

E. coli et *Enterococcus* spp. ont été respectivement dénombrées selon les normes ISO 9308-1 et 7899-1 (AFNOR). Après la filtration des volumes et des dilutions appropriées sur une membrane 0,45 µm HA047 (Millipore, France), *E. coli* et *Enterococcus* spp ont été dénombrées respectivement sur les milieux Rapid'*E. coli* additionnés du supplément eau REC2 et Rapid'*Enterococcus* (Biorad, USA). Les milieux sont ensuite incubés 24h à 37°C¹⁸ pour *E. coli* et 48h à 44°C pour *Enterococcus* spp.

3.2. Isolement de souches bactériennes

3.2.1. *Escherichia coli*

L'isolement et le stockage des souches d'*E. coli* ont été effectués à partir des milieux de dénombrement, où les colonies violettes caractéristiques (β-D-glucuronidase positives) ont été prélevées, puis isolées sur le milieu Rapid'*E. coli* (Biorad, USA) (24h à 44°C). A partir d'une colonie caractéristique bien isolée, une amplification de la biomasse a ensuite été réalisée sur milieu LB (24h à 37°C) afin de réaliser son stockage.

3.2.2. *Enterococcus* spp.

De façon analogue à *E. coli*, les colonies caractéristiques bleues d'*Enterococcus* spp. ont été prélevées, puis isolées sur le milieu Slanetz (AES Laboratoires, France) (24h - 48h à 44°C). A partir d'une colonie caractéristique bien isolée, une amplification de biomasse a été ensuite réalisée sur milieu LB (24h à 37°C) afin de réaliser son stockage.

3.2.3. Stockage

Toutes les souches d'*E. coli* et d'*Enterococcus* spp. isolées lors de ces travaux de thèse ont été stockées grâce au système Cryo-billes (AES Laboratoires, France) pour *E. coli* et dans du glycérol 80% pour *Enterococcus* spp. Ainsi, suite à ces travaux, 1520 souches d'*E. coli* et

¹⁸ Dans le cadre de cette étude, la température utilisée pour la culture et l'isolement était de 44°C afin d'éviter la propagation de flores envahissantes

Tableau 37: Antibiotiques recommandés par la CA-SFM (2010) pour la détermination des phénotypes de résistance

Antibiotique	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterococcus spp.</i>
Amoxicilline	25µg	-
Amoxicilline + acide clavulanique	20/10µg	-
Ticarcilline	25µg	-
Ticarcilline + acide clavulanique	20/10µg	-
Ampicilline	-	10µg
Céfalotine	30µg	-
Céfotaxime	30µg	-
Céftazidime	30µg	-
Kanamycine	30µg	1000µg
Gentamicine	15µg	500µg
Streptomycine	15µg	500µg
Rifampicine	-	500µg
Chloramphenicol	30µg	30µg
Acide nalidixique	30µg	-
Ciprofloxacine	30µg	5µg
Sulfaméthoxazole + triméthoprine	23,75/1,25µg	-
Tétracycline	30µg	20UI
Erythromycine	-	15UI
Lincomycine	-	15µg
Linezolide	-	30µg
Vancomycine	-	30µg

- : antibiotique non testé pour le genre ou l'espèce ; **UI** : Unité International

401 souches d'*Enterococcus* spp sont actuellement conservées à -80°C dans plusieurs laboratoires impliqués dans le programme FLASH (UMR 6143 M2C, EA 2128 et INSERM U722).

4. Détermination de la résistance bactérienne aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques des souches d'*E. coli* et d'*Enterococcus* spp a été déterminée par la méthode de diffusion sur gélose, conformément aux recommandations du comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (SFM). Les souches sont alors classées selon trois phénotypes :

- résistant (R), la souche possède un mécanisme de résistance à l'antibiotique
- intermédiaire (I), la souche peut posséder un mécanisme de résistance mais de moindre efficacité ou résulter de l'incertitude technique.
- sensible (S), la souche ne possède pas de mécanisme de résistance à l'antibiotique

Dans ces travaux, les souches *E. coli* CIP 7624 et *E. faecalis* CIP103214 (ATCC29212) ont été utilisées comme contrôle. Les profils de résistance des souches d'*Enterococcus* spp ont été déterminés par l'équipe de Roland Leclercq (EA 4655).

5. Extraction des acides nucléiques

5.1. Souches pures

Les acides nucléiques ont été extraits à partir de culture de souches pures en fin de phase exponentielle de croissance par lyse thermique à 95°C pendant 15 minutes. 2 à 3 colonies sont ensuite inoculées dans 200 µL d'eau milliQ stérile avant la lyse. Les suspensions contenant les acides nucléiques sont ensuite conservées à -20°C.

5.2. A partir d'échantillons environnementaux

Les acides nucléiques d'échantillons d'eau ont été extraits à partir de filtres 0,45 µm à l'aide d'une lyse chimique et mécanique selon le protocole du kit d'extraction Fast DNA Bio 101. Les acides nucléiques sont élués dans de l'eau milliQ stérile (DNase/RNase free) et sont alors conservés à -20°C.

Tableau 38 : Amorces oligonucléotidiques utilisées

Gène ou région codée	Amorce	Séquence	Taille amplicon	Référence
<i>intI1</i>	intI1.F	5'-CCTCCCGCACGATGATC-3'	280 pb	Bass <i>et al.</i> 99
	intI1.R	5'-TCCACGCATCGTCAGGC-3'		
<i>intI2</i>	intI2.F	5'-CACGGATATGCGACAAAAAGGT-3'	790 pb	Mazel <i>et al.</i> 00
	intI2.R	5'-GTAGCAAACGAGTGACGAAATG-3'		
<i>chuA</i>	chuA.1	5'-GACGAACCAACGGTCAGGAT-3'	279 pb	Clermont <i>et al.</i> 00
	chuA.2	5'-TGCCGCCAGTACCAAAGACA-3'		
<i>Yja</i>	YjaA.1	5'-TGAAGTGTGAGGAGACGCTG-3'	211 pb	Clermont <i>et al.</i> 00
	YjaA.2	5'-ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC-3'		
TspE4C2	TspE4C2.1	5'-GAGTAATGTCGGGGCATTCA-3'	152 pb	Clermont <i>et al.</i> 00
	TspE4C2.2	5'-CGCGCCAACAAAGTATTACG-3'		
<i>stx1</i>	SLT6	5'-ACCCTGTAACGAAGTTTGCG-3'	140 pb	Clermont <i>et al.</i> 11
	SLT7	5'-ATCTCATGCGACTACTTGAC-3'		
<i>estA</i>	AL65	5'-TTAATAGCACCCGGTACAAGCAGG-3'	169 pb	Clermont <i>et al.</i> 11
	estA.r	5'-CTTTCGCTCAGGATGCTAAACCAG-3'		
<i>eae</i>	eae.f	5'-GAACGGCAGAGGTTAATCTG-3'	203 pb	Clermont <i>et al.</i> 11
	eae.r	5'-CAATGAAGACGTTATAGCCC-3'		
<i>aaiC</i>	aaiC.f	5'-ATTGTCCTCAGGCATTTAC-3'	215 pb	Clermont <i>et al.</i> 11
	aaiC.r	5'-ACGACACCCCTGATAAACAA-3'		
<i>ipaH</i>	ipaH.f	5'-TGTATCACAGATATGGCATGC-3'	241 pb	Clermont <i>et al.</i> 11
	ipaH.r	5'-TCCGGAGATTGTTCCATGTG-3'		
<i>bfpA</i>	bfpA.f	5'-GGAAGTCAAATTCATGGGGA-3'	300 pb	Clermont <i>et al.</i> 11
	bfpA.r	5'-GGAATCAGACGCAGACTGGT-3'		
<i>eltB</i>	LT _B .f	5'-CACACGGAGCTCCTCAGTC-3'	508 pb	Clermont <i>et al.</i> 11
	LT _B .r	5'-CCCCCAGCCTAGCTTAGTTT-3'		
<i>stx 2</i>	SLT12	5'-ATCCTATTCCCGGGAGTTTACG-3'	584 pb	Clermont <i>et al.</i> 11
	SLT13	5'-GCGTCATCGTATACACAGGAGC-3'		
<i>aatA</i>	CVD432.f	5'-CTGGCGAAAGACTGTATCAT-3'	630 pb	Clermont <i>et al.</i> 11
	CVD432.r	5'-CAATGTATAGAAATCCGCTGTT-3'		
<i>afaD</i>	afaD.f	5'-GAAAGCGGTAAGCTGAAGGC-3'	670 pb	Clermont <i>et al.</i> 11
	afaD.r	5'-CCGGTGAAATAAATACTCTC-3'		
<i>mefE</i>	MEF1	5'-AGTATCATTAATCACTAGTGC-3'	348 pb	Angot <i>et al.</i> , 00
	MEF2	5'-TTCTTCTGGTACTAAAAGTGG-3'		
<i>ermB</i>	AM1	5'-GAAAAGGTACTCAACCAAATA-3'	639 pb	Angot <i>et al.</i> , 00
	AM2	5'-AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC-3'		
<i>tetM</i>	TetM-FW	5'-ACAGAAAGCTTATTATATAAC-3'	171 pb	Aminov <i>et al.</i> , 01
	TetM-RV	5'-TGGCGTGTCTATGATGTTTAC-3'		

6. Amplification génique de séquences d'ADN par PCR (réaction de polymérisation en chaîne)

6.1. PCR

La réaction de polymérisation en chaîne permet l'amplification d'une séquence précise d'ADN dont les extrémités s'hybrident spécifiquement avec deux oligonucléotides de synthèse d'une vingtaine de paires de bases, appelées amorces [Saiki *et al.*, 1988]. A la suite d'une dénaturation initiale de 5 à 15 minutes à 94°C, l'amplification est réalisée lors de la succession de plusieurs cycles (25 à 45 cycles) avec les réactions suivantes :

- **la dénaturation** de l'ADN à 94°C
- **l'hybridation** des amorces à une température spécifique de la séquence des amorces
- **la polymérisation** de l'ADN polymérase thermo-résistante à 72°C.

Enfin, à la suite de la succession des réactions au cours de cycles, une réaction d'élongation finale est réalisée à 72°C pendant 7 minutes. L'ADN polymérase utilisée est la Taq polymérase Diamonds (Eurogentec, Belgique). Des thermocycleurs Gene Amp PCR System 6700 (Perkin Elmer, USA) ont permis d'effectuer ces PCR.

Les couples d'amorces, les programmes et les conditions d'amplifications utilisées pour ces travaux de thèses sont présentés dans les tableaux 38, 39, 40. La détection des facteurs de virulence des souches d'*E. coli* et de leurs sérotypes a été réalisée par l'équipe d'Erick Denamur (INSERM U 722) selon la méthode de Clermont *et al.*, 2007 et 2011. L'identification des espèces d'*Enterococcus* par amplification du gène *ddl* (code pour une ligase) ou un fragment d'ADN interne au gène *sodA*, la détection des gènes de résistance *ermB* (codant une méthylase) et *mef* (codant une pompe à efflux), ainsi que *tetM* ont été effectuées par l'équipe de Roland Leclercq (EA4655).

6.2. Analyse électrophorétique des amplicons

L'agarose (de 1 à 3% (p/v)) est dissous dans un tampon TAE 0,5X (20 mM Tris-acétate ; 0,5 mM EDTA ; pH 8) additionné de BET à 0,1 µg.mL⁻¹. Avant d'être déposés dans les puits, les échantillons sont additionnés de tampon de charge (glycérol 50% (v/v)), bleu de bromophénol 0,25% (p/v), xylène cyanol 0,25% (p/v), Na₂EDTA 25 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,5). La migration électrophorétique s'effectue dans un tampon de migration (TAE 0,5X) sous une tension de 50 ou 100 V.cm⁻¹ dans une cuve à électrophorèse Run One Electrophoresis Cell (Embi Tec, USA). L'ADN amplifié est ensuite visualisé sous éclairage aux UV (λ=312 nm) avec un analyseur d'image (Fisher Biotec, Quantum ST4®) grâce au BET qui lui confère une fluorescence spécifique.

Tableau 39: Mélanges réactionnels des PCR effectuées

Gène ou région ciblée	Tampon 10X	dNTP (chaque)	Amorces (chaque)	Taq ADN polymérase	MgCl ₂	eau milliQ	Supplément
<i>intI1</i>	1X	200 µM	0,20 µM	0,01 U.µL ⁻¹	2 mM	q.s.p 50 µL	0,25 mg.L ⁻¹ BSA
<i>intI2</i>	1X	200 µM	0,20 µM	0,01 U.µL ⁻¹	1,5 mM	q.s.p 25 µL	-
<i>chuA</i>	1X	200 µM	1 µM	0,125 U.µL ⁻¹	1,5 mM	q.s.p 20 µL	-
<i>yja</i>	1X	200 µM	1 µM	0,125 U.µL ⁻¹	1,5 mM	q.s.p 20 µL	-
TspE4C2	1X	200 µM	1 µM	0,125 U.µL ⁻¹	1,5 mM	q.s.p 20 µL	-
<i>ermB</i>	1X	200 µM	0,25 µM	0,02 U.µL ⁻¹	2 mM	q.s.p 50µL	-
<i>mefA</i>	1X	200 µM	0,25 µM	0,05 U.µL ⁻¹	4 mM	q.s.p 50µL	-
<i>tetM</i>	1X	100 µM	25 pM	0,05 U.µL ⁻¹	1,5 mM	q.s.p 20µL	-

7. Détection et quantification des résidus médicamenteux dans les échantillons d'eau

La détection et la quantification des résidus médicamenteux ont été réalisées par l'UMR 5805 EPOC de l'université de Bordeaux (H. Budzinski, M.J Capdeville). Les échantillons d'eau ont été concentrés par extraction en phase solide (SPE) puis analysés par chromatographie en phase liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem (LC-MS/MS). La mise au point de cette méthodologie a permis la détection et la quantification de faibles quantités de 78 résidus médicamenteux dans les environnements aquatiques (Thèse M.J Capdeville). A partir de données bibliographiques, cinq classes de résidus pharmaceutiques ont été choisies incluant les antibiotiques (7 pénicillines, 5 céphalosporines, 7 macrolides, 2 lincosamides, 5 fluoroquinolones, 3 quinolones, 4 tétracyclines, 9 sulfamides, 2 phénicols, 2 polypeptides, 1 imidazole, 2 ionophores et 3 autres), les β -bloquants (atenolol, bisoprolol, metoprolol, propanolol, sotalol, timolol), les anti-cancéreux (daunorubicine, doxorubicine, epirubicine, cyclophosphamide, ifosfamide, 5-fluorouracil, docetaxel, gemcitabine, methotrexate, tamoxifen), les inhibiteurs de phosphoestérase de type 5 (sildenafil) et les anti-viraux (abacavir, lamivudine, stavudine, zidovudine, nevirapine, indinavir, nelfinavir, ritonavir et saquinavir). Parmi ces 78 résidus, seuls les antibiotiques ont été utilisés pour l'étude de la relation entre consommation et résistance bactérienne aux antibiotiques.

8. Mesures de paramètres hydrologiques

La turbidité, la conductivité électrique, la température, le niveau d'eau et la pression ont été mesurés toutes les 15 minutes à l'aide d'une sonde multi-paramètres Troll[®] 9500 *in situ* water quality instrument (In-Situ Inc, CO, USA) pendant 3 ans. Ces trois sondes étaient localisées le long du continuum agricole au niveau des sites de la Selles, de la Tourville et de la Risle. En parallèle, la pluviométrie a été mesurée avec un système ISCO 674 Rain Gauge (Teledyne ISCO Inc, Lincoln, USA) au niveau de l'exploitation agricole située à proximité du ruisseau de Selles.

9. Tests statistiques

Les différentes analyses statistiques ont été réalisées à l'aide des logiciels XLSTATS version 6.0 (addinsoft) ou GraphPad (Graphpad, San Diego, CA).

Tableau 40: Programmes des cycles d'amplification par PCR

Gène ou région ciblée	Dénaturation initiale à 94°C	Dénaturation à 94°C	Hybridation des amorces	Elongation	Extension finale	Nombre de cycles
<i>intI1</i>	10 min	1 min	1 min à 55°C	1 min 72°C	7 min à 72°C	30
<i>intI2</i>	5 min	30 sec	30 sec à 64°C	1 min à 72°C	7 min à 72°C	30
<i>chuA</i>	4 min	30 sec	10 sec à 59°C	-	7 min à 72°C	30
<i>yja</i>	4 min	30 sec	10 sec à 59°C	-	7 min à 72°C	30
TspE4C2	4 min	30 sec	10 sec à 59°C	-	7 min à 72°C	30
<i>ermB</i>	5 min	30 sec	45 sec à 47°C	1 min à 72°C	10 min à 72°C	35
<i>mefA</i>	5 min	30 sec	45 sec à 47°C	1 min à 72°C	10 min à 72°C	35
<i>tetM</i>	5 min	30 sec	30 sec à 55°C	30 sec à 72°C	7 min à 72°C	25

Références Bibliographiques :

-A-

Académie Nationale de Pharmacie (2008) Médicaments et Environnement, 105p.

Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (2011) Analyse de ventes de médicaments aux officines et aux hôpitaux en France - 1999-2009, 132p.

Agence Nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (2010) Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2009, 28p.

Al-Ahmad, A., Daschner, F. D., and Kümmerer, K. (1999) Biodegradability of cefotiam, ciprofloxacin, meropenem, penicillin G, and sulfamethoxazole and inhibition of waste water bacteria. *Archives of Environmental Contamination and toxicology*, 37(2), 158–163.

Aminov, R. I., Garrigues-Jeanjean, N., and Mackie, R. I. (2001) Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins. *Applied and environmental microbiology*, 67(1), 22–32.

Andersson, D. I. and Hughes, D. (2010) Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nature Reviews Microbiology*, 8(4), 260–271.

Andreozzi, R., Raffaele, M., and Nicklas, P. (2003) Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere*, 50(10), 1319–1330.

Angot, P., Vergnaud, M., Auzou, M., and Leclercq, R. (2000) Macrolide resistance phenotypes and genotypes in French clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 19(10), 755–758.

-B-

Badgley, B. D., Thomas, F. I. M., and Harwood, V. J. (2010) The effects of submerged aquatic vegetation on the persistence of environmental populations of *Enterococcus* spp. *Environmental Microbiology*, 12(5), 1271–1281.

Bale, M. J., Day, M. J., and Fry, J. C. (1988) Novel method for studying plasmid transfer in undisturbed river epilithon. *Applied and environmental microbiology*, 54(11), 2756–2758.

Bass, L., Liebert, C. A., Lee, M. D., Summers, A. O., White, D. G., Thayer, S. G., Maurer, J.J. (1999) Incidence and characterization of integrons, genetic elements mediating multiple-drug resistance, in avian *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 43(12), 2925.

Bennett, P. M. (2008) Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British Journal of Pharmacology*, 153(S1), S347–S357.

Beutin, L., Hammerl, J. A., Strauch, E., Reetz, J., Dieckmann, R., Kelner-Burgos, Y., Martin, A., Miko, A., Strockbine, N.A., Lindstedt, B.A. (2012) Spread of a distinct Stx2-encoding phage prototype among *E. coli* O104: H4 strains from outbreaks in Germany, Norway and Georgia. *Journal of Virology*, 86(19), 10444-10455.

de Brauwere, A., De Brye, B., Servais, P., Passerat, J., and Deleersnijder, E. (2011) Modelling *Escherichia coli* concentrations in the tidal Scheldt river and estuary. *Water research*, 45(9), 2724–2738.

Le Bris, H. and Pouliquen, H. (2004) Experimental study on the bioaccumulation of oxytetracycline and oxolinic acid by the blue mussel (*Mytilus edulis*). An evaluation of its ability to bio-monitor antibiotics in the marine environment. *Marine pollution bulletin*, 48(5), 434–440.

Brossa, L., Marcé, R. M., Borrull, F., and Pocurull, E. (2005) Occurrence of twenty - six endocrine - disrupting compounds in environmental water samples from Catalonia, Spain. *Environmental toxicology and chemistry*, 24(2), 261–267.

Brown, K. D., Kulis, J., Thomson, B., Chapman, T. H., and Mawhinney, D. B. (2006) Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico. *Science of the total environment*, 366(2-3), 772–783.

Brownell, M. J., Harwood, V. J., Kurz, R. C., McQuaig, S. M., Lukasik, J., and Scott, T. M. (2007) Confirmation of putative stormwater impact on water quality at a Florida beach by microbial source tracking methods and structure of indicator organism populations. *Water Research*, 41(16), 3747–3757.

-C-

Cambray, G., Guerout, A. M., and Mazel, D. (2010) Integrons. *Annual review of genetics*, 44, 141–166.

Capdeville, M.J. (2011) Etudes des cycles biogéochimiques des contaminants organiques dits “émergents” dans les systèmes aquatiques. Thèse de doctorat, 474p.

Chandrasekaran, S., Venkatesh, B., and Lalithakumari, D. (1998) Transfer and expression of a multiple antibiotic resistance plasmid in marine bacteria. *Current microbiology*, 37(5), 347–351.

Chen, I. and Dubnau, D. (2004) DNA uptake during bacterial transformation. *Nature Reviews Microbiology*, 2(3), 241–249.

Christian, T., Schneider, R. J., Färber, H. A., Skutlarek, D., Meyer, M. T., and Goldbach, H. E. (2003) Determination of antibiotic residues in manure, soil, and surface waters. *Acta hydrochimica et hydrobiologica*, 31(1), 36–44.

Clermont, O., Bonacorsi, S., and Bingen, E. (2000) Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), 4555–4558.

Clermont, O., Johnson, J. R., Menard, M., and Denamur, E. (2007) Determination of *Escherichia coli* O types by allele-specific polymerase chain reaction: application to the O types involved in human septicemia. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 57(2), 129–136.

Clermont, O., Olier, M., Hoede, C., Diancourt, L., Brisse, S., Keroudean, M., Glodt, J., Picard, B., Oswald, E., Denamur E. (2011) Animal and human pathogenic *Escherichia coli* strains share common genetic backgrounds. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(3), 654–662.

Córdova-Kreylos, A. L. and Scow, K. M. (2007) Effects of ciprofloxacin on salt marsh sediment microbial communities. *The ISME journal*, 1(7), 585–595.

Costanzo, S. D., Murby, J., and Bates, J. (2005) Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environment. *Marine pollution bulletin*, 51(1-4), 218–223.

Croxen, M. A. and Finlay, B. B. (2009) Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*, 8(1), 26–38.

-D-

Davies, J. and Davies, D. (2010) Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), 417–433.

Davies, J., Spiegelman, G. B., and Yim, G. (2006) The world of subinhibitory antibiotic concentrations. *Current opinion in microbiology*, 9(5), 445–453.

Derrien, M., Gourmelon, M., Mieszkina, S., Cottinet, P., Marti, R., Pourcher, A. M., Caprais M.P., Jaffrezic, A., Bilal, M., Heddadj, D. (2011) Microbial and Chemical Markers: Runoff Transfer in Animal Manure–Amended Soils. *Journal of Environmental Quality*, 40(3), 959–968.

DiDonato, G. T., Stewart, J. R., Sanger, D. M., Robinson, B. J., Thompson, B. C., Holland, A. F., Van Dolah, R.F. (2009) Effects of changing land use on the microbial water quality of tidal creeks. *Marine Pollution Bulletin*, 58(1), 97–106.

Duong, H. A., Pham, N. H., Nguyen, H. T., Hoang, T. T., Pham, H. V., Pham, V. C., Berg, M., Giger, W., Alder, A.C. (2008) Occurrence, fate and antibiotic resistance of fluoroquinolone antibacterials in hospital wastewaters in Hanoi, Vietnam. *Chemosphere*, 72(6), 968–973.

-E-

van Elsas, J. D., Semenov, A. V., Costa, R., and Trevors, J. T. (2010) Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects. *The ISME journal*, 5(2), 173–183.

-F-

Fajardo, A. and Martínez, J. L. (2008) Antibiotics as signals that trigger specific bacterial responses. *Current opinion in microbiology*, 11(2), 161–167.

Forget-Leray, J., Landriau, I., Minier, C., and Leboulenger, F. (2005) Impact of endocrine toxicants on survival, development, and reproduction of the estuarine copepod *Eurytemora affinis* (Pope). *Ecotoxicology and environmental safety*, 60(3), 288–294.

Frost, L. S., Leplae, R., Summers, A. O., and Toussaint, A. (2005) Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 3(9), 722–732.

-G-

Gao, J. and Pedersen, J. A. (2005) Adsorption of sulfonamide antimicrobial agents to clay minerals. *Environmental science & technology*, 39(24), 9509–9516.

Garcia-Armisen, T., Tournon, A., Petit, F., and Servais, P. (2005) Sources of faecal contamination in the Seine estuary (France). *Estuaries and Coasts*, 28(4), 627–633.

Ge, L., Chen, J., Wei, X., Zhang, S., Qiao, X., Cai, X., Xie, Q. (2010) Aquatic photochemistry of fluoroquinolone antibiotics: kinetics, pathways, and multivariate effects of main water constituents. *Environmental science & technology*, 44(7), 2400–2405.

Giger, W., Alder, A. C., Golet, E. M., Kohler, H. P. E., McArdell, C. S., Molnar, E., Siegrist, H., Suter, M.J.F. (2003) Occurrence and fate of antibiotics as trace contaminants in wastewaters, sewage sludges, and surface waters. *CHIMIA International Journal for Chemistry*, 57(9), 485–491.

Githinji, L. J. M., Musey, M. K., and Ankumah, R. O. (2011) Evaluation of the Fate of Ciprofloxacin and Amoxicillin in Domestic Wastewater. *Water, Air, & Soil Pollution*, 219(1), 191–201.

Göbel, A., Thomsen, A., McArdell, C. S., Joss, A., and Giger, W. (2005) Occurrence and sorption behavior of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in activated sludge treatment. *Environmental science & technology*, 39(11), 3981–3989.

Göbel, A., McArdell, C. S., Joss, A., Siegrist, H., and Giger, W. (2007) Fate of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in different wastewater treatment technologies. *Science of the total environment*, 372(2-3), 361–371.

Goh, E. B., Yim, G., Tsui, W., McClure, J. A., Surette, M. G., and Davies, J. (2002) Transcriptional modulation of bacterial gene expression by subinhibitory concentrations of antibiotics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(26), 17025.

Golet, E. M., Xifra, I., Siegrist, H., Alder, A. C., and Giger, W. (2003) Environmental exposure assessment of fluoroquinolone antibacterial agents from sewage to soil. *Environmental Science & Technology*, 37(15), 3243–3249.

Gómez, M. J., Petrović, M., Fernández-Alba, A. R., and Barceló, D. (2006) Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters. *Journal of Chromatography A*, 1114(2), 224–233.

Griffith, F. (1928) The significance of pneumococcal types. *Journal of Hygiene*, 27(02), 113–159.

Gu, C., Karthikeyan, K. G., Sibley, S. D., and Pedersen, J. A. (2007) Complexation of the antibiotic tetracycline with humic acid. *Chemosphere*, 66(8), 1494–1501.

Gullberg, E., Cao, S., Berg, O. G., Ilbäck, C., Sandegren, L., Hughes, D., Andersson D.I. (2011) Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLoS Pathogens*, 7(7), e1002158.

-H-

Hall, R. M., Collis, C. M., Kim, M. I. J., Partridge, S. R., Recchia, G. D., and Stokes, H. W. (1999) Mobile gene cassettes and integrons in evolution. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 870(1), 68–80.

Hamelin, K., Bruant, G., El-Shaarawi, A., Hill, S., Edge, T. A., Fairbrother, J., Harel, J., Maynard, C., Masson, L., Brousseau, R. (2007) Occurrence of virulence and antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli* isolates from different aquatic ecosystems within the St. Clair River and Detroit River areas. *Applied and environmental microbiology*, 73(2), 477–484.

Hansen, P. K., Lunestad, B. T., and Samuelsen, O. B. (1992) Effects of oxytetracycline, oxolinic acid, and flumequine on bacteria in an artificial marine fish farm sediment. *Canadian Journal of Microbiology*, 38(12), 1307–1312.

Hartmann, A., Alder, A. C., Koller, T., and Widmer, R. M. (1998) Identification of fluoroquinolone antibiotics as the main source of umuC genotoxicity in native hospital wastewater. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17(3), 377–382.

Hauchard, E., Delahaye, D., and Freiré-Díaz, S. (2002) Organisation fractale de l'occupation du sol: conséquences sur le ruissellement et le ravinement dans les terres de grande culture/Fractal organization of the soil occupation: consequences on the runoff and gully erosion in arable cropping areas. *Géomorphologie: relief, processus, environnement*, 8(2), 181–196.

Herzer, P. J., Inouye, S., Inouye, M., and Whittam, T. S. (1990) Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 172(11), 6175–6181.

Hirsch, R., Ternes, T., Haberer, K., and Kratz, K. L. (1999) Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *The Science of the Total Environment*, 225(1-2), 109–118.

van Hoek, A. H. A. M., Mevius, D., Guerra, B., Mullany, P., Roberts, A. P., and Aarts, H. J. M. (2011) Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Frontiers in microbiology*, 2.

Hollis, J. M. (1991) Mapping the vulnerability of aquifers and surface waters to pesticide contamination at the national/regional scale. *Pesticides in Soils and Water*, BCPC Monograph, (47), 165–174.

Hunter, P. R. (2003) Drinking water and diarrhoeal disease due to *Escherichia coli*. *Journal of water and health*, 1(2), 65–72.

-I-

Ishii, S., Ksoll, W. B., Hicks, R. E., and Sadowsky, M. J. (2006) Presence and growth of naturalized *Escherichia coli* in temperate soils from Lake Superior watersheds. *Applied and environmental microbiology*, 72(1), 612–621.

-J-

Jannot, A. (2010) Fonctionnement hydrologique du bassin versant de la Risle : analyse des régimes et modélisation. Mémoire de Master, 52p.

Jiang, S. C. and Paul, J. H. (1998) Gene transfer by transduction in the marine environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(8), 2780–2787.

Jiménez, C., Narvaez, J. F., and Penuela, G. A. (2012) Pharmaceutical products in the environment: sources, effects and risks. *Vitae*, 19(1), 92–108.

Juignet, P. (1974) La transgression crétacée sur la bordure orientale du Massif armoricain. Thèse de doctorat, 786p.

-K-

Karthikeyan, K. G. and Meyer, M. T. (2006) Occurrence of antibiotics in wastewater treatment facilities in Wisconsin, USA. *Science of the total environment*, 361(1-3), 196–207.

Kay, D., Bartram, J., Prüss, A., Ashbolt, N., Wyer, M. D., Fleisher, J. M., Fewtrell, L., Rogers, A., Rees, G. (2004) Derivation of numerical values for the World Health Organization guidelines for recreational waters. *Water Research*, 38(5), 1296–1304.

Kim, S., Eichhorn, P., Jensen, J. N., Weber, A. S., and Aga, D. S. (2005) Removal of antibiotics in wastewater: effect of hydraulic and solid retention times on the fate of tetracycline in the activated sludge process. *Environ. Sci. Technol*, 39(15), 5816–5823.

Knapp, C. W., Cardoza, L. A., Hawes, J. N., Wellington, E. M. H., Larive, C. K., and Graham, D. W. (2005) Fate and effects of enrofloxacin in aquatic systems under different light conditions. *Environmental science & technology*, 39(23), 9140–9146.

Koczura, R., Mokracka, J., Jabłońska, L., Gozdecka, E., Kubek, M., and Kaznowski, A. (2011) Antimicrobial resistance of integron-harboring *Escherichia coli* isolates from clinical samples, wastewater treatment plant and river water. *Science of the Total Environment*, 14(1), 680–685.

Kohanski, M. A., DePristo, M. A., and Collins, J. J. (2010) Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. *Molecular cell*, 37(3), 311–320.

Kools, S. A. E., Moltmann, J. F., and Knacker, T. (2008) Estimating the use of veterinary medicines in the European Union. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 50(1), 59–65.

Kothary, M. H. and Babu, U. S. (2001) Infective dose of foodborne pathogens in volunteers: a review. *Journal of Food Safety*, 21(1), 49–68.

Kristiansson, E., Fick, J., Janzon, A., Grabic, R., Rutgersson, C., Weijdegård, B., Söderström, H., Larsson, D.G.J. (2011) Pyrosequencing of antibiotic-contaminated river sediments reveals high levels of resistance and gene transfer elements. *PLoS One*, 6(2), e17038.

Kümmerer, K., Steger-Hartmann, T., and Meyer, M. (1997) Biodegradability of the anti-tumour agent ifosfamide and its occurrence in hospital effluents and communal sewage. *Water Research*, 31(11), 2705–2710.

Kümmerer, K. (2009) Antibiotics in the aquatic environment-A review-Part I. *Chemosphere*, 75(4), 417–434.

Kümmerer, K. and Al-Ahmad, A. (2010) Estimation of the cancer risk to humans resulting from the presence of cyclophosphamide and ifosfamide in surface water. *Environmental Science and Pollution Research*, 17(2), 486–496.

Kuntz, G., Dewolf, Y., and Monciardini, C. (1981) Carte géologique de Beaumont-le-Roger à 1/50 000. Ed. BRGM.

Kuntz, G., Dewolf, Y., and Wyns, R. (1977) Carte géologique de Saint André de l'Eure à 1/50 000. Ed. BRGM.

Kuntz, G. and Monciardini, C. (1985) Carte géologique de Rugles à 1/50 000. Ed. BRGM.

Kuntz, G., Monciardini, C., and Verron, G. (1982) Carte géologique de Breteuil sur Iton à 1/50 000 et notice explicative. Ed BRGM.

Kuntz, G. and Wyns, R. (1976) Carte géologique de Gisors à 1/50 000.

-L-

Laiguel, B. (2003) Caractérisation et dynamique érosive de systèmes géomorphologiques continentaux sur substrat crayeux. Exemple de l'Ouest du Bassin de Paris dans le contexte nord-ouest européen. Habilitation à Diriger des Recherches, 138p.

Laiguel, B. (1999) Les altérites à silex de l'Ouest du Bassin de Paris: caractérisation lithologique, genèse et utilisation potentielle comme granulats. Thèse de Doctorat, 219p.

Laiguel, B., Quesnel, F., Spencer, C., Meyer, R., and Lautridou, J. P. (2003) Slope clay - with - flints (biefs à silex) as indicators of Quaternary periglacial dynamics in the western part of the Paris Basin, France. *Journal of Quaternary Science*, 18(3 - 4), 295–299.

Lambert, P. A. (2005) Bacterial resistance to antibiotics: modified target sites. *Advanced drug delivery reviews*, 57(10), 1471–1485.

- Längin, A., Alexy, R., König, A., and Kümmerer, K.** (2009) Deactivation and transformation products in biodegradability testing of β -lactams amoxicillin and piperacillin. *Chemosphere*, 75(3), 347–354.
- Lanka, E. and Wilkins, B. M.** (1995) DNA processing reactions in bacterial conjugation. *Annual review of biochemistry*, 64(1), 141–169.
- Lanthier, M. L. M., Scott, A. S. A., Lapen, D. R. L. D. R., Zhang, Y. Z. Y., and Topp, E. T. E.** (2010) Frequency of virulence genes and antibiotic resistances in *Enterococcus* spp. isolates from wastewater and feces of domesticated mammals and birds, and wildlife. *Canadian journal of microbiology*, 56(9), 715–729.
- Laroche, E., Pawlak, B., Berthe, T., Skurnik, D., and Petit, F.** (2009) Occurrence of antibiotic resistance and class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli* isolated from a densely populated estuary (Seine, France). *FEMS microbiology ecology*, 68(1), 118–130.
- Laroche, E., Petit, F., Fournier, M., and Pawlak, B.** (2010) Transport of antibiotic-resistant *Escherichia coli* in a public rural karst water supply. *Journal of Hydrology*, 392(1), 12–21.
- Larsson, D. G., de Pedro, C., and Paxeus, N.** (2007) Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *Journal of hazardous materials*, 148(3), 751–755.
- Lautridou, J. P.** (1985) Le cycle périglaciaire pléistocène en Europe du Nord-Ouest et plus particulièrement en Normandie. Thèse de Doctorat, 905p.
- Leavis, H. L., Willems, R. J. L., Top, J., and Bonten, M. J. M.** (2006) High-level ciprofloxacin resistance from point mutations in *gyrA* and *parC* confined to global hospital-adapted clonal lineage CC17 of *Enterococcus faecium*. *Journal of clinical microbiology*, 44(3), 1059–1064.
- Leclercq, R., Derlot, E., Weber, M., Duval, J., and Courvalin, P.** (1989) Transferable vancomycin and teicoplanin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 33(1), 10–15.
- Levy, S. B. and Marshall, B.** (2004) Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature medicine*, 10, S122–S129.
- Li, D., Yang, M., Hu, J., Ren, L., Zhang, Y., and Li, K.** (2008a) Determination and fate of oxytetracycline and related compounds in oxytetracycline production wastewater and the receiving river. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(1), 80–86.
- Li, K., Yediler, A., Yang, M., Schulte-Hostede, S., and Wong, M. H.** (2008b) Ozonation of oxytetracycline and toxicological assessment of its oxidation by-products. *Chemosphere*, 72(3), 473–478.
- Lindberg, R. H., Wennberg, P., Johansson, M. I., Tysklind, M., and Andersson, B. A. V.** (2005) Screening of human antibiotic substances and determination of weekly mass flows in five sewage treatment plants in Sweden. *Environmental science & technology*, 39(10), 3421–3429.

Lindberg, R., Jarnheimer, P. A., Olsen, B., Johansson, M., and Tysklind, M. (2004) Determination of antibiotic substances in hospital sewage water using solid phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry and group analogue internal standards. *Chemosphere*, 57(10), 1479–1488.

Lleò, M. M., Bonato, B., Benedetti, D., and Canepari, P. (2005) Survival of enterococcal species in aquatic environments. *FEMS microbiology ecology*, 54(2), 189–196.

Luczkiewicz, A., Jankowska, K., Fudala-Ksiazek, S., and Olanczuk-Neyman, K. (2010) Antimicrobial resistance of fecal indicators in municipal wastewater treatment plant. *Water research*, 44, 5089–5097.

Luis Campos, J., Garrido, J. M., Mendez, R., and Lema, J. M. (2001) Effect of two broad-spectrum antibiotics on activity and stability of continuous nitrifying system. *Applied biochemistry and biotechnology*, 95(1), 1–10.

Lyautey, E., Lu, Z., Lapen, D. R., Wilkes, G., Scott, A., Berkers, T., Edge, T.A., Topp, E. (2010) Distribution and diversity of *Escherichia coli* populations in the South Nation River drainage basin, Eastern Ontario, Canada. *Applied and environmental microbiology*, 76(5), 1486–1496.

-M-

Mallin, M. A., Williams, K. E., Esham, E. C., and Lowe, R. P. (2000) Effect of human development on bacteriological water quality in coastal watersheds. *Ecological Applications*, 10(4), 1047–1056.

Martinez, J. L. (2009) The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1667), 2521–2530.

Martinez, J. L. and Baquero, F. (2000) Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44(7), 1771–1777.

Maruyama, F., Tani, K., Kenzaka, T., Yamaguchi, N., and Nasu, M. (2006) Quantitative determination of free-DNA uptake in river bacteria at the single-cell level by *in situ* rolling-circle amplification. *Applied and environmental microbiology*, 72(9), 6248–6256.

Massey, L. B., Haggard, B. E., Galloway, J. M., Loftin, K. A., Meyer, M. T., and Green, W. R. (2010) Antibiotic fate and transport in three effluent-dominated Ozark streams. *Ecological Engineering*, 36(7), 930–938.

Mazel, D., Dychinco, B., Webb, V. A., and Davies, J. (2000) Antibiotic resistance in the ECOR collection: integrons and identification of a novel *aad* gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(6), 1568–1574.

Mazel, D. (2006) Integrons: agents of bacterial evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 4(8), 608–620.

Metcalf, C. D., Miao, X. S., Koenig, B. G., and Struger, J. (2003) Distribution of acidic and neutral drugs in surface waters near sewage treatment plants in the lower Great Lakes, Canada. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22(12), 2881–2889.

Miao, X. S., Bishay, F., Chen, M., and Metcalfe, C. D. (2004) Occurrence of antimicrobials in the final effluents of wastewater treatment plants in Canada. *Environmental science & technology*, 38(13), 3533–3541.

Minier, C., Caltot, G., Leboulanger, F., and Hill, E. M. (2000) An investigation of the incidence of intersex fish in Seine-Maritime and Sussex regions. *Analysis*, 28(9), 801–806.

Mouelhi, S., Michel, C., Perrin, C., and Andréassian, V. (2006a) Linking stream flow to rainfall at the annual time step: the Manabe bucket model revisited. *Journal of hydrology*, 328(1), 283–296.

Mouelhi, S., Michel, C., Perrin, C., and Andréassian, V. (2006b) Stepwise development of a two-parameter monthly water balance model. *Journal of Hydrology*, 318(1), 200–214.

Murray, B. E. (1990) The life and times of the *Enterococcus*. *Clinical Microbiology Reviews*, 3(1), 46–65.

-N-

Naas, T., Mikami, Y., Imai, T., Poirel, L., and Nordmann, P. (2001) Characterization of In53, a class 1 plasmid-and composite transposon-located integron of *Escherichia coli* which carries an unusual array of gene cassettes. *Journal of bacteriology*, 183(1), 235–249.

Näslund, J., Hedman, J. E., and Agestrand, C. (2008) Effects of the antibiotic ciprofloxacin on the bacterial community structure and degradation of pyrene in marine sediment. *Aquatic Toxicology*, 90(3), 223–227.

Nielsen, K. M., Johnsen, P. J., Bensasson, D., and Daffonchio, D. (2007) Release and persistence of extracellular DNA in the environment. *Environmental biosafety research*, 6(1-2), 37–53.

Nikolakopoulou, T. L., Giannoutsou, E. P., Karabatsou, A. A., and Karagouni, A. D. (2008) Prevalence of tetracycline resistance genes in Greek seawater habitats. *The Journal of Microbiology*, 46(6), 633–640.

Nikolaou, A., Meric, S., and Fatta, D. (2007) Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387(4), 1225–1234.

Novick, R. and Summers, D. K. (1997) The biology of plasmids. *Trends in Genetics*, 13(2), 82–83.

-O-

Organisation Mondiale de la Santé (2001) WHO Global strategy for containment of Antimicrobial resistance.

-P-

Partridge, S. R., Tsafnat, G., Coiera, E., and Iredell, J. R. (2009) Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS microbiology reviews*, 33(4), 757–784.

Paul, J. H., Frischer, M. E., and Thurmond, J. M. (1991) Gene transfer in marine water column and sediment microcosms by natural plasmid transformation. *Applied and environmental microbiology*, 57(5), 1509–1515.

Pei, R., Kim, S. C., Carlson, K. H., and Pruden, A. (2006) Effect of river landscape on the sediment concentrations of antibiotics and corresponding antibiotic resistance genes (ARG). *Water research*, 40(12), 2427–2435.

Pérez - Parada, A., Agüera, A., Gómez - Ramos, M. M., García - Reyes, J. F., Heinzen, H., and Fernández - Alba, A. R. (2011) Behavior of amoxicillin in wastewater and river water: identification of its main transformation products by liquid chromatography/electrospray quadrupole time - of - flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 25(6), 731–742.

Perrin, C., Michel, C., and Andréassian, V. (2003) Improvement of a parsimonious model for streamflow simulation. *Journal of Hydrology*, 279(1), 275–289.

-Q-

Quesnel, F. (1997) Cartographie numérique en géologie de surface - Application aux altérites à silex de l'ouest du Bassin de Paris. Thèse de Doctorat, 255p.

-R-

Radjenović, J., Petrović, M., and Barceló, D. (2009) Fate and distribution of pharmaceuticals in wastewater and sewage sludge of the conventional activated sludge (CAS) and advanced membrane bioreactor (MBR) treatment. *Water research*, 43(3), 831–841.

Ratajczak, M., Laroche, E., Berthe, T., Clermont, O., Pawlak, B., Denamur, E., Petit, F. (2010) Influence of hydrological conditions on the *Escherichia coli* population structure in the water of a creek on a rural watershed. *BMC microbiology*, 10(1), 222.

Ratajczak, M. (2011) Devenir des populations d'*Escherichia coli* dans l'environnement aquatique: Structure, Viabilité et Attachement aux particules. Thèse de Doctorat, 138p.

Recorbet, G., Picard, C., Normand, P., and Simonet, P. (1993) Kinetics of the persistence of chromosomal DNA from genetically engineered *Escherichia coli* introduced into soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(12), 4289–4294.

Roberts, M. C. (2005) Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS microbiology letters*, 245(2), 195–203.

Roberts, P. H. and Thomas, K. V. (2006) The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment. *Science of the Total Environment*, 356(1), 143–153.

Roe, M. T., Vega, E., and Pillai, S. D. (2003) Antimicrobial resistance markers of class 1 and class 2 integron-bearing *Escherichia coli* from irrigation water and sediments. *Emerging Infectious Diseases*, 9(7), 822–826.

Rozen, Y. and Belkin, S. (2001) Survival of enteric bacteria in seawater. *FEMS microbiology reviews*, 25(5), 513–529.

-S-

Sáenz, Y., Vinué, L., Ruiz, E., Somalo, S., Martínez, S., Rojo-Bezares, B., Zarazaga, M., Torres, C. (2010) Class 1 integrons lacking *qacEΔ1* and *sul1* genes in *Escherichia coli* isolates of food, animal and human origins. *Veterinary microbiology*, 144(3-4), 493–497.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839), 487–491.

Santos, L. H., Araújo, A. N., Fachini, A., Pena, A., Delerue-Matos, C., and Montenegro, M. (2010) Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of hazardous materials*, 175(1-3), 45–95.

Savageau, M. A. (1983) *Escherichia coli* habitats, cell types, and molecular mechanisms of gene control. *American Naturalist*, 732–744.

van Schaik, W., Top, J., Riley, DR., Boekhorst, J., Vrijenhoek, JE., Schapendonk, CM., Hendrickx, AP., Nijman, IJ., Bonten, MJ., Tettelin, H., Willems, RJ. (2010) Pyrosequencing-based comparative genome analysis of the nosocomial pathogen *Enterococcus faecium* and identification of a large transferable pathogenicity island. *BMC Genomics*, 11, 239.

Scheytt, T., Mersmann, P., Lindstädt, R., and Heberer, T. (2005) 1-Octanol/water partition coefficients of 5 pharmaceuticals from human medical care: carbamazepine, clofibrate, diclofenac, ibuprofen, and propyphenazone. *Water, Air, & Soil Pollution*, 165(1), 3–11.

Schlüter, A., Szczepanowski, R., Kurz, N., Schneiker, S., Krahn, I., and Pühler, A. (2007) Erythromycin resistance-conferring plasmid pRSB105, isolated from a sewage treatment plant, harbors a new macrolide resistance determinant, an integron-containing Tn402-like element, and a large region of unknown function. *Applied and environmental microbiology*, 73(6), 1952–1960.

Selander, R. K., Caugant, D. A., Ochman, H., Musser, J. M., Gilmour, M. N., and Whittam, T. S. (1986) Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Applied and environmental microbiology*, 51(5), 873.

Servais, P. and Passerat, J. (2009) Antimicrobial resistance of fecal bacteria in waters of the Seine river watershed (France). *Science of the Total Environment*, 408(2), 365–372.

Sibley, S. D. and Pedersen, J. A. (2007) Interaction of the macrolide antimicrobial clarithromycin with dissolved humic acid. *Environmental science & technology*, 42(2), 422–428.

Sinton, L. W., Braithwaite, R. R., Hall, C. H., and Mackenzie, M. L. (2007) Survival of indicator and pathogenic bacteria in bovine feces on pasture. *Applied and environmental microbiology*, 73(24), 7917–7925.

Sinton, L. W., Finlay, R. K., and Hannah, D. J. (1998) Distinguishing human from animal faecal contamination in water: a review. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 32(2), 323–348.

Smith, D. L., Rooks, D. J., Fogg, P. C. M., Darby, A. C., Thomson, N. R., McCarthy, A. J., Allison, H.E. (2012) Comparative genomics of Shiga toxin encoding bacteriophages. *BMC genomics*, 13(1), 311.

Soto, S. M., Martín, M. C., and Mendoza, M. C. (2003) Distinctive human and swine strains of *Salmonella enterica* serotype Wien carry large self-transferable R-plasmids. A plasmid contains a class 1-qacE Δ 1-*sulI* integron with the *dfrA1-aadA1a* cassette configuration. *Food microbiology*, 20(1), 9–16.

-T-

Tamtam, F., Mercier, F., Le Bot, B., Eurin, J., Tuc Dinh, Q., Clément, M., Chevreuil, M. (2008) Occurrence and fate of antibiotics in the Seine River in various hydrological conditions. *Science of the Total Environment*, 393(1), 84–95.

Tamtam, F., Le Bot, B., Dinh, T., Mompelat, S., Eurin, J., Chevreuil, M., Bonté, P., Mouchel, J.M., Ayrault, S. (2011) A 50-year record of quinolone and sulphonamide antimicrobial agents in Seine River sediments. *Journal of Soils and Sediments*, 11(5), 852–859.

Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., and Denamur, E. (2010) The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews: Microbiology*, 8(3), 207–217.

Thal, L. A., Chow, J. W., Mahayni, R., Bonilla, H., Perri, M. B., Donabedian, S. A., Silverman, J., Taber, S., Zervos, M.J. (1995) Characterization of antimicrobial resistance in enterococci of animal origin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 39(9), 2112–2115.

Thomas, C. M. and Nielsen, K. M. (2005) Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nature reviews microbiology*, 3(9), 711–721.

Toleman, M. A., Bennett, P. M., and Walsh, T. R. (2006) ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? *Microbiology and molecular biology reviews*, 70(2), 296–316.

Tong, L., Eichhorn, P., Perez, S., Wang, Y., and Barcelo, D. (2011) Photodegradation of azithromycin in various aqueous systems under simulated and natural solar radiation: Kinetics and identification of photoproducts. *Chemosphere*, 83(3), 340–348.

Top, J., Willems, R., Bonten, M. (2008) Emergence of CC17 *Enterococcus faecium*: from commensal to hospital-adapted pathogen. FEMS Immunol. Med. Microbiol., 52(1), 297-308.

de la Torre, A., Iglesias, I., Carballo, M., Ramírez, P., Muñoz, M. J. (2012) An approach for mapping the vulnerability of European Union soils to antibiotic contamination. Science of the Total Environment, 414, 672 – 679.

Touren, A. (2005) Contribution à l'analyse du risque microbiologique en estuaire de Seine: Présence et devenir de *Salmonella* et relation aux flores indicatrices. Thèse de Doctorat, 204p.

Touren, A., Berthe, T., Gargala, G., Fournier, M., Ratajczak, M., Servais, P., Petit, F. (2007) Assessment of faecal contamination and the relationship between pathogens and faecal bacterial indicators in an estuarine environment (Seine, France). Marine pollution bulletin, 54(9), 1441–1450.

-U-

Ueki, M., Matsui, K., Choi, K., and Kawabata, Z. (2004) The enhancement of conjugal plasmid pBHR1 transfer between bacteria in the presence of extracellular metabolic products produced by *Microcystis aeruginosa*. FEMS microbiology ecology, 51(1), 1–8.

-V-

Valdes, D. (2005) Variabilité spatiale du fonctionnement hydrologique de l'aquifère karstique de la craie (département de l'Eure, France). Thèse de Doctorat, 258p.

-W-

Walk, S. T., Mladonicky, J. M., Middleton, J. A., Heidt, A. J., Cunningham, J. R., Bartlett, P., Sato, K., Whittam, T.S. (2007) Influence of antibiotic selection on genetic composition of *Escherichia coli* populations from conventional and organic dairy farms. Applied and environmental microbiology, 73(19), 5982–5989.

Walsh, C. (2000) Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. Nature, 406(6797), 775–781.

Walsh, T. R. (2006) Combinatorial genetic evolution of multiresistance. Current opinion in microbiology, 9(5), 476–482.

Watkinson, A. J., Micalizzi, G. B., Graham, G. M., Bates, J. B., and Costanzo, S. D. (2007) Antibiotic resistant *Escherichia coli* in wastewaters, surface waters and oysters from an urban riverine system. Applied and environmental microbiology, AEM. 00763–07v1.

Watkinson, A. J., Murby, E. J., Kolpin, D. W., and Costanzo, S. D. (2009) The occurrence of antibiotics in an urban watershed: From wastewater to drinking water. Science of the total environment, 407(8), 2711–2723.

Wazi, N. (1988) Le Crétacé du Roumois (Vallée de l'Oison) et le tertiaire-quaternaire des régions voisines de la basse vallée de la Seine (Haute-Normandie). Stratigraphie et tectonique. Thèse de Doctorat, 552p.

Webster, L. F., Thompson, B. C., Fulton, M. H., Chestnut, D. E., Van Dolah, R. F., Leight, A. K., Scott, G.I. (2004) Identification of sources of *Escherichia coli* in South Carolina estuaries using antibiotic resistance analysis. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 298(2), 179–195.

Wiedenmann, A., Krüger, P., Dietz, K., López-Pila, J. M., Szewzyk, R., and Botzenhart, K. (2006) A randomized controlled trial assessing infectious disease risks from bathing in fresh recreational waters in relation to the concentration of *Escherichia coli*, intestinal enterococci, *Clostridium perfringens*, and somatic coliphages. *Environmental health perspectives*, 114(2), 228.

Wise, R. (2002) Antimicrobial resistance: priorities for action. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49(4), 585–586.

Wright, G. D. (2005) Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Advanced drug delivery reviews*, 57(10), 1451–1470.

Wright, G. D. (2007) The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nature Reviews Microbiology*, 5(3), 175–186.

Wunder, D. B., Bosscher, V. A., Cok, R. C., and Hozalski, R. M. (2011) Sorption of antibiotics to biofilm. *Water research*, 45(6), 2270–2280.

-X-

Xu, H., Broersma, K., Miao, V., and Davies, J. (2011) Class 1 and class 2 integrons in multidrug-resistant gram-negative bacteria isolated from the Salmon River, British Columbia. *Canadian journal of microbiology*, 57(6), 460–467.

Xu, W. H., Zhang, G., Wai, O. W. H., Zou, S. C., and Li, X. D. (2009) Transport and adsorption of antibiotics by marine sediments in a dynamic environment. *Journal of Soils and Sediments*, 9(4), 364–373.

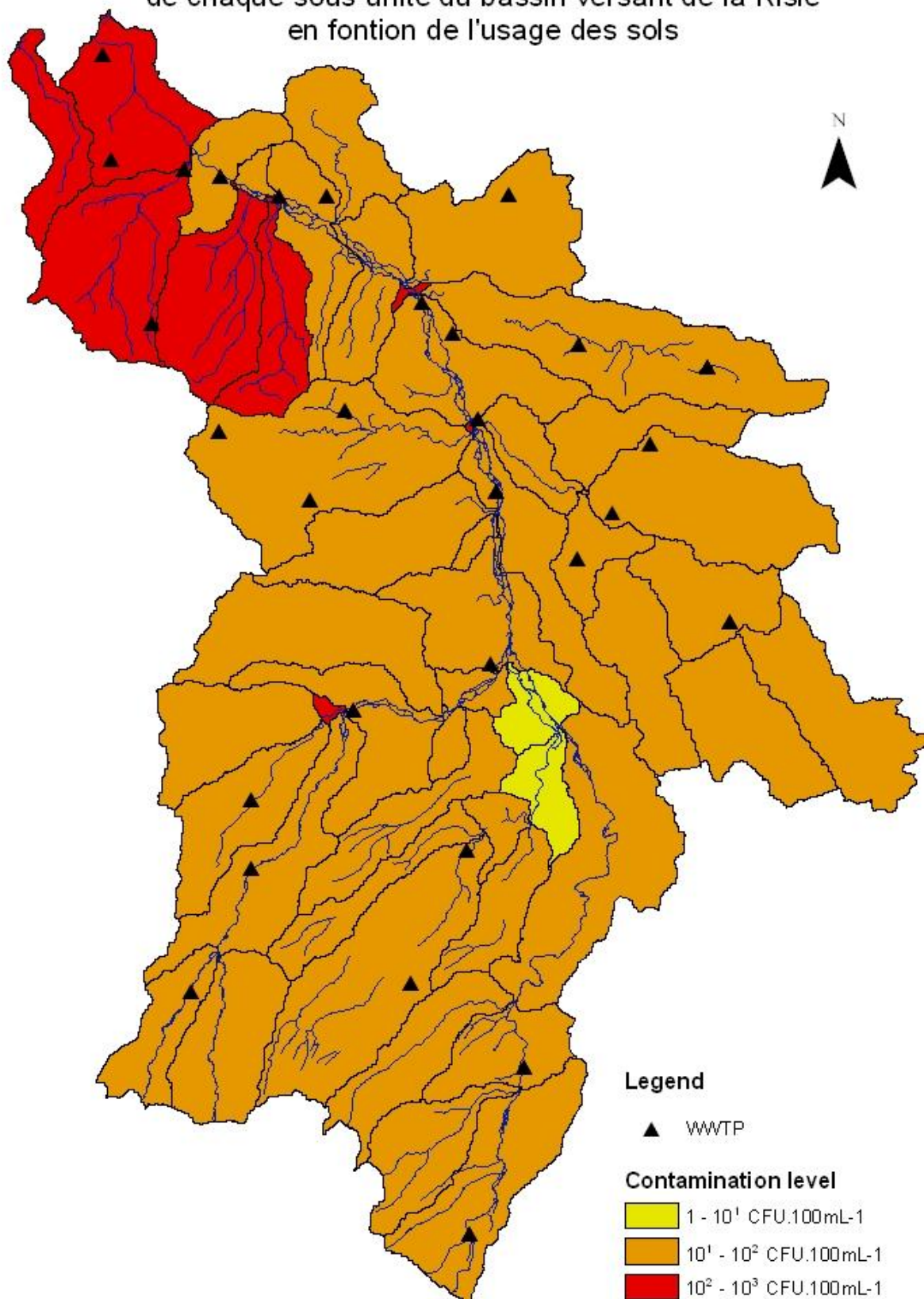
-Z-

Zuccato, E., Castiglioni, S., Bagnati, R., Melis, M., and Fanelli, R. (2010) Source, occurrence and fate of antibiotics in the Italian aquatic environment. *Journal of hazardous materials*, 179(1-3), 1042–1048.

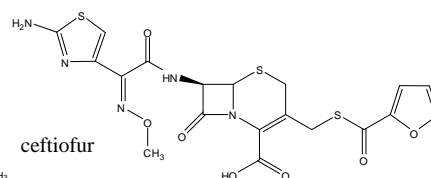
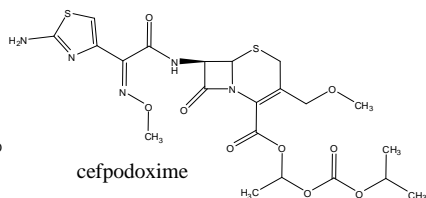
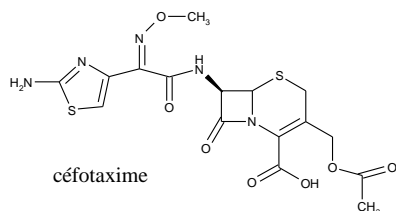
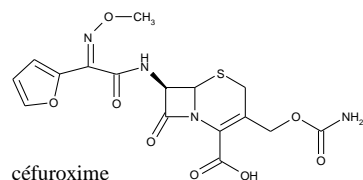
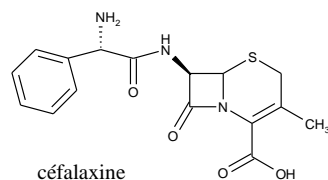
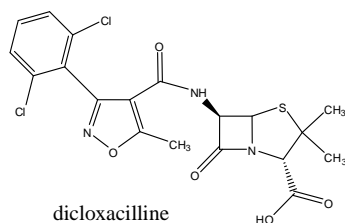
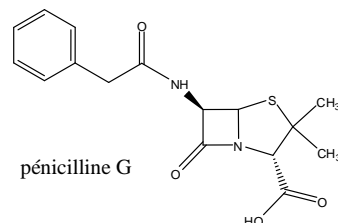
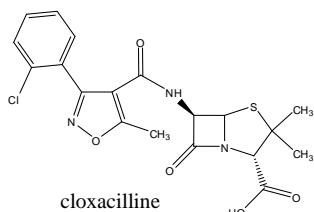
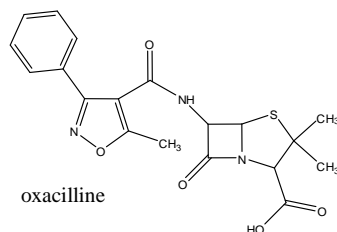
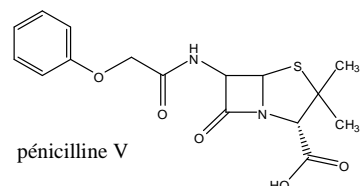
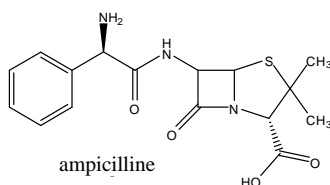
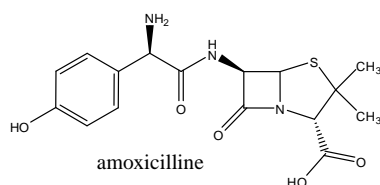
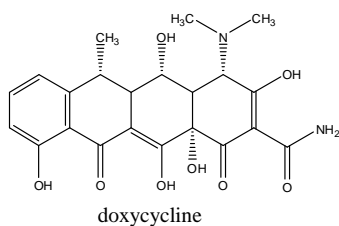
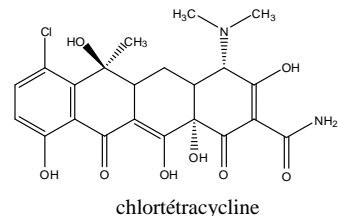
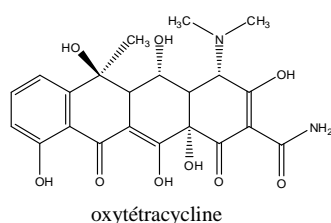
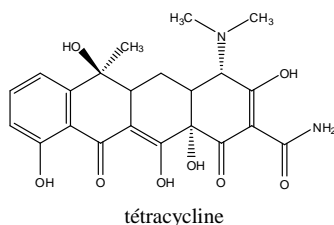
Zwiener, C. and Frimmel, F. H. (2004) LC-MS analysis in the aquatic environment and in water treatment technology—a critical review. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 378(4), 862–874.

ANNEXES

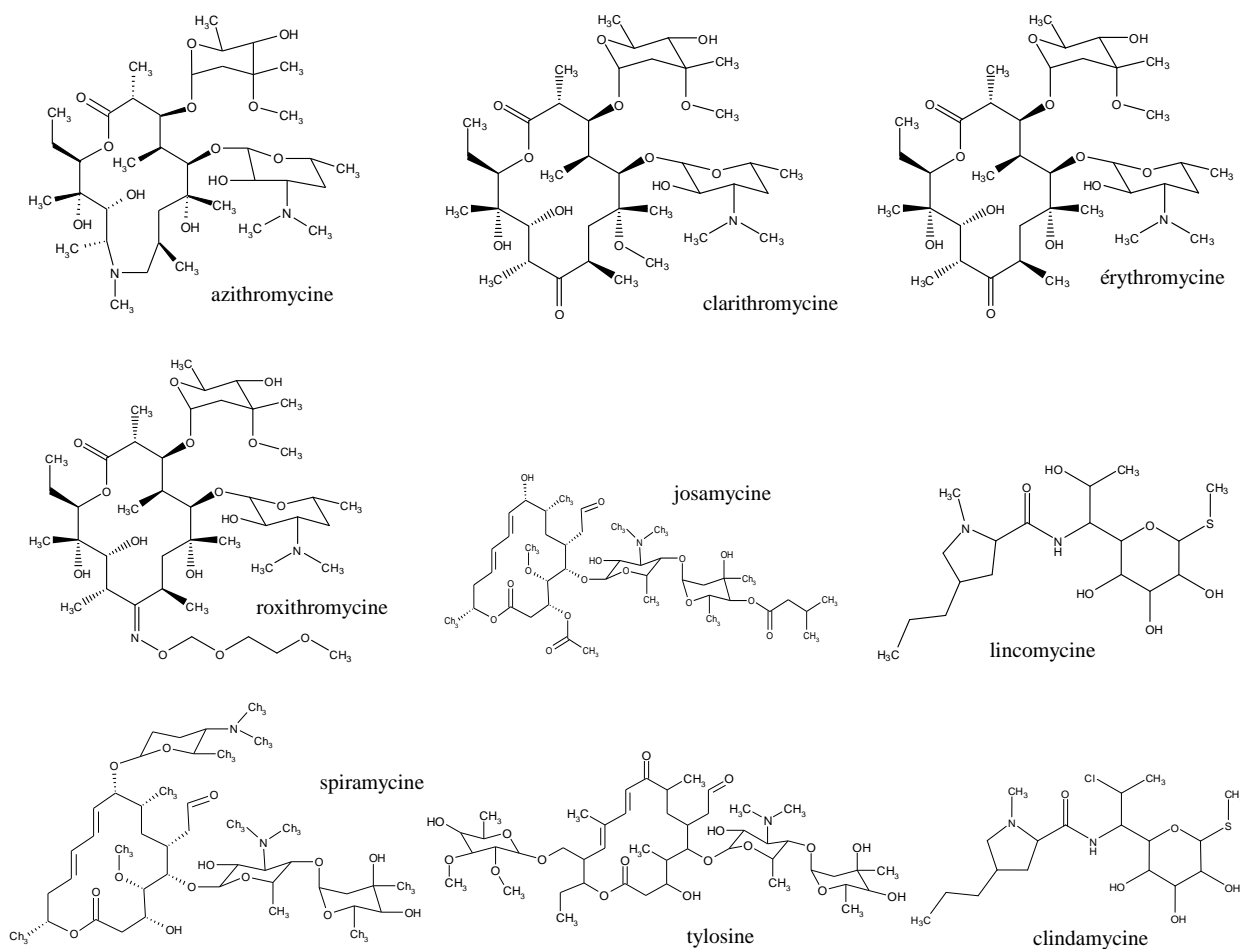
Carte de prédiction de la contamination microbiologique
de chaque sous-unité du bassin versant de la Risle
en fonction de l'usage des sols



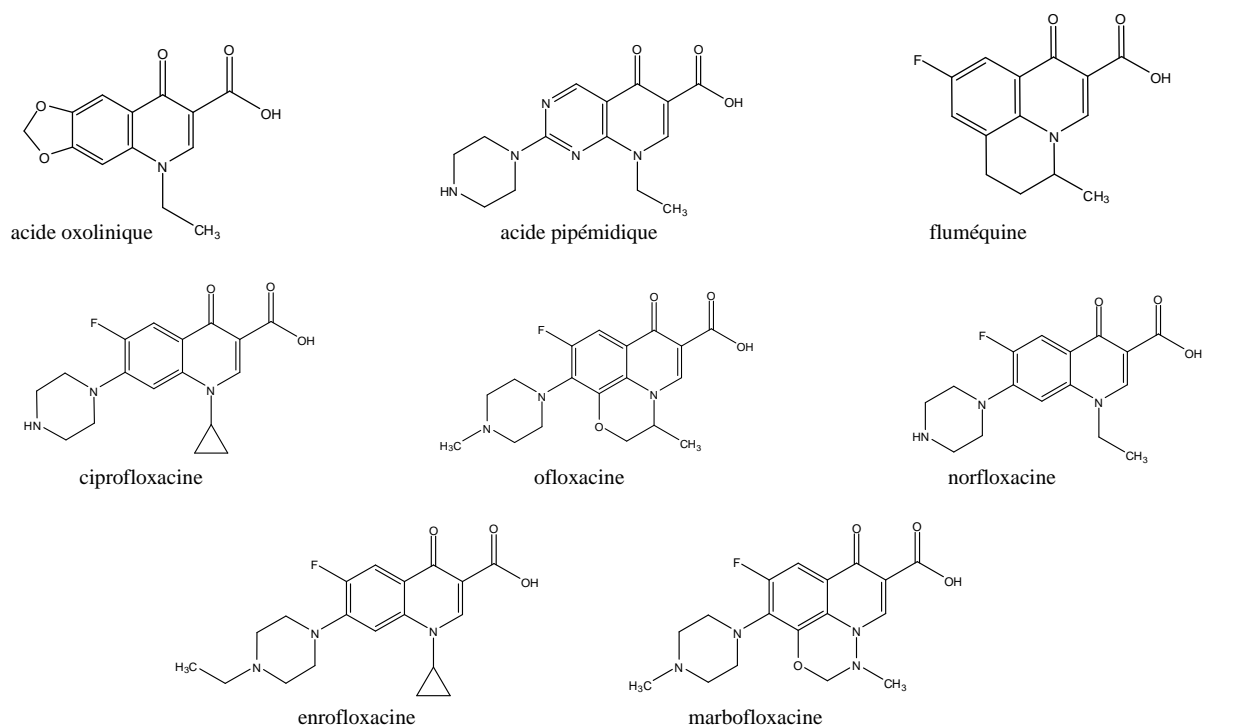
Annexe 1: Cartographie de la vulnérabilité des eaux à l'échelle du bassin versant de la Risle

Annexe 2 : Structures molécules antibiotiques détectables par la techniques LC MS/MS***Les pénicillines et céphalosporines******Les tétracyclines***

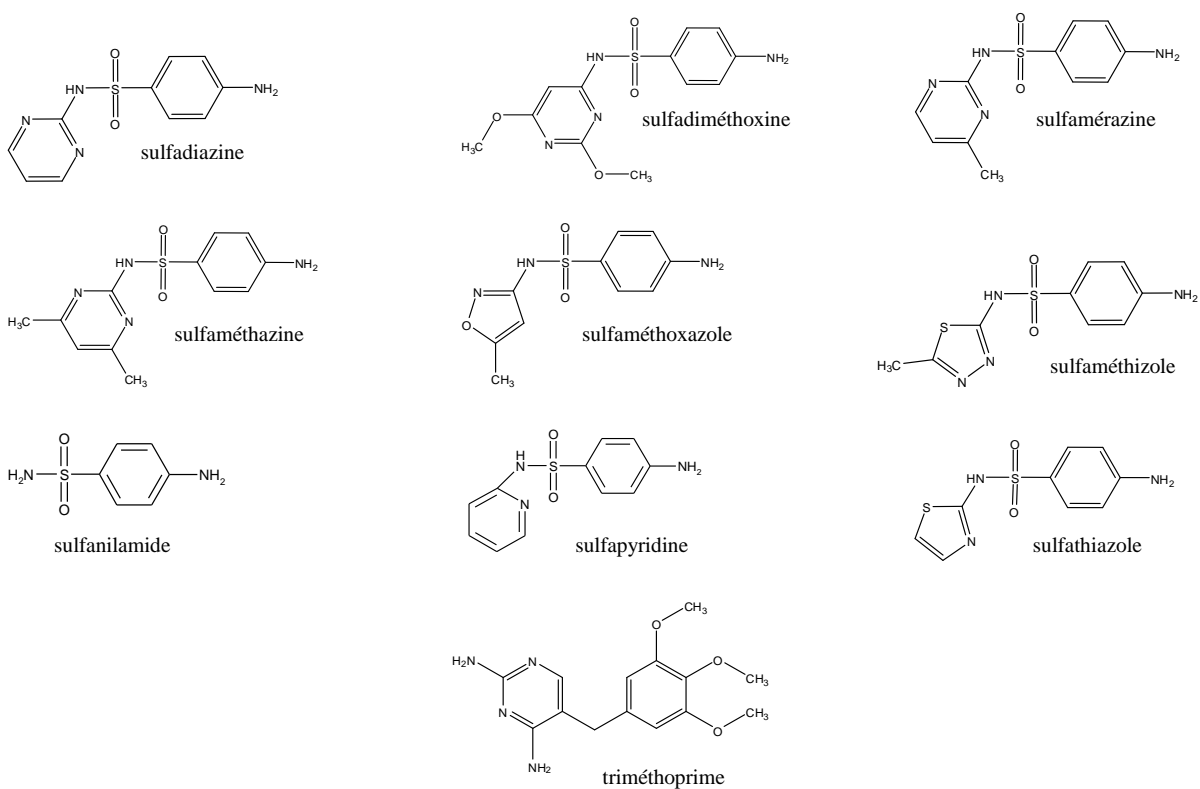
Les macrolides et lincosamides



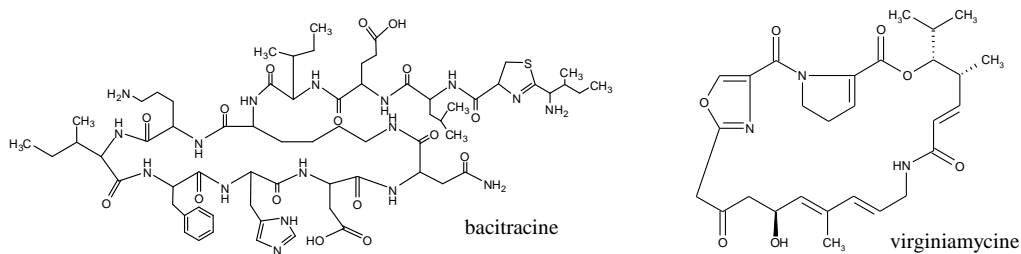
Les quinolones et fluoroquinolones



Les sulfonamides



Les polypeptides



Les phénicolés



Les autres antibiotiques

